

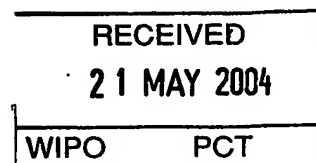
日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日      2 0 0 3 年 1 0 月 2 3 日  
Date of Application:

出 願 番 号      特 願 2 0 0 3 - 3 6 3 6 2 3  
Application Number:  
[ST. 10/C] :      [ J P 2 0 0 3 - 3 6 3 6 2 3 ]



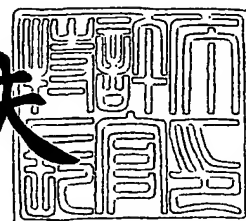
出 願 人  
Applicant(s):      J S R 株式会社  
株式会社オクテック

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   4 月   5 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願  
【整理番号】 J530-10640  
【提出日】 平成15年10月23日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都新宿区若葉一丁目22番1 株式会社オクテック内  
    【氏名】 奥村 勝弥  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都中央区築地五丁目6番10号 J S R株式会社内  
    【氏名】 三原 誠  
【発明者】  
    【住所又は居所】 東京都中央区築地五丁目6番10号 J S R株式会社内  
    【氏名】 吉岡 睦彦  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000004178  
    【氏名又は名称】 J S R株式会社  
【特許出願人】  
    【識別番号】 502128800  
    【氏名又は名称】 株式会社オクテック  
【代理人】  
    【識別番号】 100081994  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 鈴木 俊一郎  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100103218  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 牧村 浩次  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100107043  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 高畑 ちより  
【選任した代理人】  
    【識別番号】 100110917  
    【弁理士】  
    【氏名又は名称】 鈴木 亨  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2003-122514  
    【出願日】 平成15年 4月25日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 014535  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1  
    【包括委任状番号】 9912908  
    【包括委任状番号】 0206793

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

均一な孔径を有するストレートな細孔が均一な孔間隔で形成されたフィルターが底部に設けられたウエルを備えることを特徴とするバイオチップ。

**【請求項 2】**

一体に形成された複数の前記ウエルを備えることを特徴とする請求項 1 に記載のバイオチップ。

**【請求項 3】**

単数の前記ウエルを備えることを特徴とする請求項 1 に記載のバイオチップ。

**【請求項 4】**

前記ウエルの側部の下端に、別途の受け皿容器に設けられた凸部と嵌合する位置合わせ用の凹部、あるいは受け皿容器に設けられた凹部と嵌合する位置合わせ用の凸部が形成されていることを特徴とする請求項 1～3 のいずれかに記載のバイオチップ。

**【請求項 5】**

前記ウエルにおけるフィルターの上面側または下面側に補強用リブ部が設けられていることを特徴とする請求項 1～4 のいずれかに記載のバイオチップ。

**【請求項 6】**

前記補強用リブ部が、複数の貫通孔が形成された一体形状であることを特徴とする請求項 5 に記載のバイオチップ。

**【請求項 7】**

前記補強用リブ部が、前記フィルターと直接に接合されていることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載のバイオチップ。

**【請求項 8】**

前記補強用リブ部が、前記フィルターと同一材料で連続形成されていることを特徴とする請求項 5 または 6 に記載のバイオチップ。

**【請求項 9】**

前記ウエルの底部に、その周縁から所定の幅で、フィルターの細孔が形成されていない無孔部が設けられていることを特徴とする請求項 1～8 のいずれかに記載のバイオチップ。

**【請求項 10】**

第一のフィルターが底部に設けられるとともに、ウエルを挟んで第一のフィルターとは反対側に第二のフィルターが設けられていることを特徴とする請求項 1～9 のいずれかに記載のバイオチップ。

**【請求項 11】**

一体に形成された複数のウエルもしくは単数のウエルを収納する容器を備えることを特徴とする請求項 1～10 のいずれかに記載のバイオチップ。

**【請求項 12】**

前記容器が、前記ウエルと一体に形成されていることを特徴とする請求項 11 に記載のバイオチップ。

**【請求項 13】**

前記容器が、前記ウエルと独立に形成されていることを特徴とする請求項 11 に記載のバイオチップ。

**【請求項 14】**

前記ウエルに、プローブ担持粒子が分散された分散液が収容されていることを特徴とする請求項 1～13 のいずれかに記載のバイオチップ。

**【請求項 15】**

前記ウエルに、プローブ識別情報を与えるための少なくとも一種の識別手段を有するプローブ担持粒子が分散された分散液が収容されていることを特徴とする請求項 14 に記載のバイオチップ。

**【請求項 16】**

前記識別手段が、プローブ担持粒子の色、形状および粒子径から選ばれる少なくとも一種であることを特徴とする請求項 15 に記載のバイオチップ。

【請求項 17】

全ての前記識別手段におけるプローブ識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、前記プローブ識別情報が同一であることを特徴とする請求項 15 または 16 に記載のバイオチップ。

【請求項 18】

全ての前記識別手段におけるプローブ識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、前記プローブ識別情報が異なっていることを特徴とする請求項 15 または 16 に記載のバイオチップ。

【請求項 19】

少なくとも一種の前記識別手段におけるプローブ識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、その全ての識別手段における前記プローブ識別情報の構成が同一であることを特徴とする請求項 15 または 16 に記載のバイオチップ。

【請求項 20】

少なくとも一種の前記識別手段におけるプローブ識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、その少なくとも一種の前記識別手段における前記プローブ識別情報の構成が異なっていることを特徴とする請求項 15 または 16 に記載のバイオチップ。

【請求項 21】

請求項 11～20 のいずれかに記載のバイオチップの容器に収容された溶液中でウエルを上下させることにより、当該容器内の溶液と、ウエル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることを特徴とするバイオチップの操作方法。

【請求項 22】

請求項 11～20 のいずれかに記載のバイオチップの容器に収容された溶液の界面を上下させることにより、当該容器内の溶液と、ウエル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることを特徴とするバイオチップの操作方法。

【請求項 23】

前記容器内の溶液と、ウエル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることにより、バイオチップ内の内容物の混合、拡散、反応、分離または洗浄を行うことを特徴とする請求項 21 または 22 に記載のバイオチップの操作方法。

【請求項 24】

前記バイオチップの各ウエルに同一の被検体を投入することを特徴とする請求項 21～23 のいずれかに記載のバイオチップの操作方法。

【請求項 25】

前記バイオチップの各ウエルに異なる被検体を投入することを特徴とする請求項 21～23 のいずれかに記載のバイオチップの操作方法。

【請求項 26】

以下の (1)～(3) の工程を含むことを特徴とする被検体中の標的物質とプローブとの反応方法：

(1) 請求項 11 に記載のバイオチップのウエルに、請求項 17～20 のいずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウエルに収納する工程；

(2) 前記バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；および

(3) バイオチップの容器に収容された前記溶液中でウエルを上下させるか、あるいはバイオチップの容器に収容された前記溶液の界面を上下させることにより被検体中の標的物質とプローブとの反応を行う工程。

**【請求項 27】**

以下の(1)～(4)の工程を含むことを特徴とする被検体中から標的物質をB/F分離する方法:

(1) 請求項11に記載のバイオチップのウエルに、請求項17～20のいずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウエルに収納する工程;

(2) 前記バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程;

(3) 前記溶液の界面の高さを、ウエル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウエル内から除去する工程;および

(4) 洗浄液をバイオチップのウエルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウエルに循環させて該バイオチップのウエル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウエル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程。

**【請求項 28】**

以下の(1)～(5)の工程を含むことを特徴とする被検体中の標的物質の分画分離方法:

(1) 請求項11に記載のバイオチップのウエルに、請求項17～20のいずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウエルに収納する工程;

(2) 前記バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程;

(3) 前記溶液の界面の高さを、ウエル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウエル内から除去する工程;

(4) 洗浄液をバイオチップのウエルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウエルに循環させて該バイオチップのウエル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウエル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程;および

(5) 前記バイオチップのウエルの下端に設けられた凹部または凸部と嵌合する凸部または凹部を有する容器と該バイオチップとを嵌合させ、次いで分離剤溶液を投入して、これにより前記粒子から被検体中の標的物質を分離し、前記容器内における前記ウエルに対応する区画へ移動させる工程。

**【請求項 29】**

以下の(1)～(6)の工程を含むことを特徴とする被検体中の標的物質とプローブの相互作用の検出・同定方法:

(1) 請求項11に記載のバイオチップのウエルに、請求項17～20のいずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウエルに収納する工程;

(2) 前記バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程;

(3) 前記溶液の界面の高さを、ウエル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウエル内から除去する工程;

(4) 洗浄液をバイオチップのウエルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウエルに循環させて該バイオチップのウエル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウエル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程;

(5) ウエル内の粒子をフィルターの細孔に位置させる工程;および

(6) 前記粒子に担持されたプローブと被検体の標的物質との反応または相互作用を検出・同定する工程。

**【請求項 30】**

工程（６）において、粒子ごとに、粒子のプロープ識別情報と前記粒子に担持されたプロープと被検体の標的物質との反応または相互作用の情報の双方を検出することを特徴とする請求項 29 に記載の被検体中の標的物質の検出・同定方法。

【請求項 31】

工程（６）において、各ウェルごとの粒子について、前記粒子に担持されたプロープ識別情報を識別し、次いでプロープと被検体中の標的物質との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の状態情報に基づき、ウェル単位での相互作用情報を算出することを特徴とする請求項 29 に記載の被検体中の標的物質の検出・同定方法。

## 【書類名】明細書

## 【発明の名称】バイオチップおよびその使用方法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、プローブ担持粒子を収納したウエルを備えるバイオチップ、当該プローブ担持粒子と相互作用する被検体物質中の標的物質とプローブとの反応もしくは相互作用方法、被検体から標的物質をB/F分離する方法、標的物質を被検体から分離分画する方法、および被検物質中の標的物質とバイオプローブとの反応相互作用の検出・同定方法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

二本鎖DNAは、例えば加熱により一本鎖DNAとした場合でも、これらの構造が相補的であるため相互に結合するという性質を有し、この性質を利用して、ノーザンハイブリダイゼーション法が確立された。そして、従来、適当な長さの特定の配列を有するDNAを制限酵素などでフラグメント化したもの、あるいは合成したオリゴヌクレオチドをプローブとして使用し、これらと相補的な配列を有するDNAフラグメントやオリゴヌクレオチド等を検索することが標準的な手法として行われてきた。

## 【0003】

しかしながら、ノーザンハイブリダイゼーション法は、操作が煩雑であり、少数の被検体を処理する場合であっても、短時間にこれらを処理することができないという問題点があった。このため、ノーザンハイブリダイゼーション法を応用した簡便な処理方法として、スライドガラス等の基板上に上記のようなオリゴヌクレオチド等を高密度に固定化し、短時間で分析を行うことができるDNAチップが開発され、現在、汎用に使用されている。

## 【0004】

このDNAチップの代表的な例として、シリコン等の平面基板上にオリゴヌクレオチドが固定されたものがある。このチップは、基板上に1塩基を固定した後、この塩基と他の塩基とを1塩基ずつ結合させて、20～30塩基程度の長さまで伸張させて作成することができ、光照射下または酸の存在下で所定の塩基配列をもつオリゴヌクレオチドを直接チップ上で合成してDNAチップを製造することができる。例えば特許文献8には、シリコン等の基板上にオリゴヌクレオチド等をIn Situ合成したDNAチップが記載されている。

## 【0005】

あるいは、cDNAあるいは予め合成しておいた適当な長さのオリゴヌクレオチド等の核酸を基板上に結合させて作成することができ、この方法では、別途用意した核酸を粒子担体から分離し、これをスポッターにより所定位置にスポットする、いわゆるブラウン法が用いられる。

## 【0006】

しかし、前者の方法では、塩基配列をチップ上で合成するため、一部の塩基配列で合成ミスが生じると、そのチップ全体が不良品となってしまう。この結果、チップの歩留まりは $y^{4np}$ となる。ここで、 $y$ は1回の塩基合成工程における正合成確率、 $n$ は塩基数、 $p$ はプローブ数である。したがって、プローブ数が増えると歩留まりが幾何級数に低下することになる。そこで、予備のプローブを設けて不良プローブの代替プローブを設けることが行われているが、基板面積が大きくなる。

## 【0007】

一方、後者の方法では、DNAのスポット量とスポット位置は、スポッターの精度などに大きく依存し、良好な再現性を得ることが難しい。

## 【0008】

また、これらのマイクロアレーあるいはDNAチップでは1被検体について数万項目の核酸等のプローブが搭載可能であり、数万項目の同時他項目検査が可能である一方、プロ

ープは基板に固定されており、被検体とプローブとの反応は固定されたプローブと液体中の被検体との反応、いわゆる固液反応と称される反応となる。一般に固液反応は反応効率が悪く、被検体とのいわゆるハイブリダイズ反応は数時間を要する。

#### 【0009】

また、目的とする塩基配列を有する核酸を精度良く検出するためには、狭いスペースに効率よく、この核酸と相補的な配列を有する核酸（以下、「プローブ」ともいう。）を固定する必要がある。このようなプローブを基板上に固定できる数は、個々のプローブの占有面積とDNAチップ自体の大きさから定まり、一定数以上を固定することは物理的に不可能である。そして、現在使用されているDNAチップのような、被検体に浸漬して反応させるスタイルのチップでは、使用可能な被検体溶液の量が非常に少ない場合もあることから、チップ自体は小さい方がよい。

#### 【0010】

しかし、チップの大きさを小さくしていくと、プローブを固定できる面積が小さくなることから、狭いスペースのために検出信号が弱くなり、検出感度が低下する。

#### 【0011】

こうした点を改良すべく、最近では、三次元ゲル上に上記のようなプローブを固定したチップが製造され、市販されている（例えば、非特許文献1を参照）。これらのチップでは、プローブが三次元ゲル上に三次元的に固定され、プローブ密度が高いために検出信号の強度は高くなるが、ノイズの信号強度も高くなるためにS/N比が上がらず、検出精度の大幅な改善は難しい。ここでノイズの信号強度が上がってしまう要因としては、三次元ゲル上に固定されたプローブと被検体との非特異的反応によって形成された生成物の除去が難しいことが考えられる。

#### 【0012】

一方、中空糸を束ねて、これらの中空糸の内面側壁にプローブを結合させて三次元化プローブを形成し、これによりプローブ密度を向上させたチップも開発されている（特許文献1を参照）。

#### 【0013】

また、垂直異方性の細孔を有する多孔質アルミナ基板を用い、この垂直な孔の内壁にプローブを固定して三次元構造とすることでプローブ密度を上げ、さらに孔が垂直に空いたフローダウン構造を利用して、被検体とプローブとを反応させた後に非標的物質を洗浄除去することが可能なバイオチップも近年開発されている（特許文献2を参照）。

#### 【0014】

このようにプローブを中空糸の内面側壁あるいは多孔質アルミナの細孔内壁と結合する上記したいずれの方法においても、プローブは固定壁に固定されているために、被検体とプローブとが反応する際には、被検体が固定されたプローブへ近接あるいは接触する必要がある。しかしながら、このプローブの大きさは、反応空間容積と比較すれば極めて微小であり、反応空間のスケールで見れば、プローブは固定壁からわずかに突起として飛び出しているに過ぎず、被検体がプローブに近接あるいは接触する確率は極めて低い。したがって、これらの方法では反応のために長時間の攪拌を必要とする。

#### 【0015】

また、このように三次元構造の内壁にプローブを固定化した場合、孔の深さを深くすると、プローブと標的物質との反応を光学的に検出する際に光のロスが大きくなってしまう。さらに、プローブが固定された位置により攪拌ムラが生じ、例えば隅側は攪拌されにくく、反応が行われにくいなどの問題がある。

#### 【0016】

上記のように固定壁へプローブを固定する代わりに、粒子へプローブを担持して、このプローブ担持粒子を含む溶液中で、プローブ担持粒子と被検体中の標的物質とを反応させる方法も行われている。この方法は、プローブ担持粒子が溶液中に三次元的に分散していることと、プローブ担持粒子と被検体とが相互に移動することができることから、反応性が非常に高いというメリットがある。例えば、ラテックス粒子表面のプローブに被検体中



の標的物質を特異的に反応させ、何らかのB/F (Bound form / Free form) 分離によって、特異的にプローブに反応結合した標的物質の内容を解析する検出・同定方法が知られている。

#### 【0017】

非特許文献2には、被検体である標的核酸と、粒子に担持された核酸プローブとを溶液中でハイブリダイズさせた後、遠心分離して未反応の被検体を除去する方法が記載されており、この方法は現在でも広く使用されている。しかしながら、このように遠心分離を用いると、分離に時間を要し、また分離性能がそれほど高くないという問題点がある。

#### 【0018】

特許文献3、4には、プローブを担持する粒子として磁性の粒子を使用し、磁石によりこの磁性粒子を固定して、未反応の被検体を洗浄除去する方法が記載されている。この方法も現在広く使用されている。しかし、磁性粒子は一般に磁気特性を発揮するためには1ミクロン以上の大きさが必要であり、フェライト等の金属磁性成分を含有するため比重が大きく、沈降や凝集し易く保存性や操作性に注意が必要である。

#### 【0019】

特許文献5には、被検体である標的核酸と、粒子に担持された核酸プローブとを溶液中でハイブリダイズさせた後、濾紙で濾過洗浄を行い、濾紙上に濃縮された反応由来の信号を測定する方法が記載されており、この方法も広く使用されている。しかし、この方法では粒子として用いるラテックス粒子の量が非常に多く、濾過に時間を要するとともに、濾紙が目詰まりし易い。

#### 【0020】

また、これらの文献に記載された、プローブ担持粒子を使用するいずれの方法においても、1種類の被検体に対して、複数のプローブによる多項目同時検査 (Multiplex Assay) あるいは多項目同時分離分画を行うことができない。

#### 【0021】

プローブ担持粒子を使用して多項目同時検査を行う方法として、複数のプローブを識別する何らかの識別ラベルを付けた粒子を用いる方法が提案されている。例えば特許文献9、10、11には、蛍光着色した複数の粒子あるいは粒子径の異なる複数の粒子を用い、粒子毎に異なるプローブを担持させ、色や粒子径等でプローブの種類を特定し、被検体とプローブ担持粒子との反応をフローサイトメーターで検出する方法が記載されており、この方法も現在用いられている。

#### 【0022】

しかし、この方法では被検体と反応させたプローブ担持粒子をフィルター付き96孔プレートで濾過するか、あるいは遠心分離等の方法でB/F分離した後に、フローサイトメーターに分注して検出している。この場合、被検体は一度フィルター付きプレートや遠心分離用遠沈管で処理されその後フローサイトメーターに掛けられるために、工程が増えるとともに、プレートや管による汚染や被検体の付着による減損の可能性もある。

#### 【0023】

また、色で識別する方法では、識別し得る色の種類に限度があり、一定の波長範囲と光強度の組み合わせで分光できる光は約100種類であり、したがって、約100種類の色と強度の組み合わせ、すなわち100種類のプローブの同時検査が限度といわれている。

#### 【0024】

この他、特許文献6には、粒子サイズとその形状により粒子を識別する方法が記載されている。また、特許文献7には、粒子を一次元あるいは二次元に配列し、種類の異なるプローブ粒子を区分するために、サイズの異なる微粒子を分離隔壁として用いる方法が記載されている。

#### 【0025】

上記した各文献に記載された、粒子を識別して多項目同時検査を行ういずれの方法においても、粒子の識別のためにフローサイトメーターによる検出が行われている。しかしながら、このフローサイトメーターによる方法では、粒子を細管中に流し、この細管の透明

部分からレーザーを照射して粒子をシーケンシャルに識別するために、検出時間が掛かるという問題点がある。また、検出時間を短縮するためには1個の粒子識別に時間が掛けられず、検出精度が低下する可能性がある。また、フローサイトメーターの細管は高価であり、被検体を替えるごとに細管を取り替えることはコスト的に困難である。このため、被検体を替えるごとに細管を洗浄する必要がある、洗浄を充分に行うためにはさらに時間を要する。

#### 【0026】

バイオチップには、そのプローブとしてDNAフラグメントまたはオリゴヌクレオチドを固定したDNAチップの他、抗原および抗体等のタンパクあるいはこれらのタンパクと特異的に反応するあるいは相互作用する化学物質を固定したプロテインチップ等があるが、上述してきた各問題点は、これらのプロテインチップ等においても同様に存在する。

#### 【0027】

これらのDNAチップ、およびプロテインチップは、基板上に固定する各種のプローブによって、生物の持つ遺伝子の機能解析；各種感染症等の疾病の罹患状況を確認するための臨床検査；遺伝子多型解析；テーラーメード治療と称される、患者の遺伝子配列に応じた治療医薬の選定；医薬品開発のための化学物質あるいはたん白のスクリーニングあるいは化学物質の、毒性スクリーニング；その他の各種スクリーニング等に応用することができる。

#### 【0028】

しかしながら、こうした各種の用途に応用するためには、現在使用されているバイオチップでは検出感度が充分ではない。例えば、病気を極く初期で発見するためには、病気の極く初期の段階において細胞から細胞外に出てくる、極めて微量である病気由来のマーカーを検出する必要があるが、現状のバイオチップによる検出感度では、この極微量のマーカーを検出するためには不十分であるといわれており、より高感度のバイオチップが必要とされている。

#### 【0029】

また、患者の病気の状態に関する正確な情報を得て、診断誤差を最小限にするためには、単一のプローブでは不十分であり、複数の異なるプローブによる多項目同時検査が望ましい。したがって、高い検出感度で多項目同時検査を行うことができるバイオチップが要望されている。

【特許文献1】特開2000-181074号公報

【特許文献2】特表平9-504864号公報（国際公開第01/12846号公報）

【特許文献3】特開昭63-27000号公報

【特許文献4】特許第2975603号公報

【特許文献5】特開昭63-27000号公報

【特許文献6】特開平11-243997号公報

【特許文献7】特開2000-346842号公報

【特許文献8】特開昭63-27000号公報

【特許文献9】米国特許第5,736,330号公報

【特許文献10】特開昭62-81566号公報

【特許文献11】特公平7-54324号公報

【特許文献12】米国特許第6,023,540号公報

【非特許文献1】Analytical Clinica Acta 第444巻 p. 69-78 (2001年)

【非特許文献2】Nucleic Acid Research 第14巻 p. 5037-5048 (1986年)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

#### 【0030】

本発明は、上記した従来技術の問題点を解決するために為されたものであり、その目的は、

- ・高効率に短時間で被検体中の標的物質とプローブが反応し、
- ・B/F分離効率が高く、
- ・高感度での検出・同定が可能であるバイオチップを提供することにある。

#### 【0031】

さらに、本発明の目的は、

- ・当該バイオチップを用いた、一被検体からの少なくとも一種類以上の標的物質の分離分画方法

- ・多数の被検体から同時並行に少なくとも一種類以上の標的物質を分離分画する方法
- ・一被検体からの少なくとも一種類以上の標的物質のアッセイ方法
- ・多数の被検体からの同時並行に行う少なくとも一種類以上の標的物質のアッセイ方法を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

#### 【0032】

本発明のバイオチップは、均一な孔径を有するストレートな細孔が均一な孔間隔で形成されたフィルターが底部に設けられたウエルを備えることを特徴とする。

#### 【0033】

また、本発明のバイオチップは、一体に形成された複数の前記ウエルもしくは単数の前記ウエルを備えることを特徴とする。

#### 【0034】

また、本発明のバイオチップは、前記ウエルの側部の下端に、別途の受け皿容器に設けられた凸部と嵌合する位置合わせ用の凹部、あるいは受け皿容器に設けられた凹部と嵌合する位置合わせ用の凸部が形成されていることを特徴とする。

#### 【0035】

また、本発明のバイオチップは、少なくとも一部の前記ウエルにおけるフィルターの上面側または下面側に補強用リブ部が設けられていることを特徴とする。前記補強用リブ部は、複数の貫通孔が形成された一体形状であることが好ましい。また、前記補強用リブ部が、前記フィルターと直接に接合されているか、あるいは前記フィルターと同一材料で連続形成されていることが好ましい。

#### 【0036】

また、本発明のバイオチップは、前記ウエルの底部に、その周縁から所定の幅で、フィルターの細孔が形成されていない無孔部が設けられていることを特徴とする。

#### 【0037】

また、本発明のバイオチップは、第一のフィルターが底部に設けられるとともに、ウエルを挟んで第一のフィルターとは反対側に第二のフィルターが設けられていることを特徴とする。

#### 【0038】

また、本発明のバイオチップは、一体に形成された複数のウエルもしくは単数のウエルを収納する容器を備えることを特徴とする。この場合、前記容器は、前記ウエルと一体に形成されるか、あるいは前記ウエルと独立に形成されていてもよい。

#### 【0039】

また、本発明のバイオチップは、前記ウエルに、プローブ担持粒子が分散された分散液が収容されていることを特徴とする。また、本発明のバイオチップは、前記ウエルに、プローブ識別情報を与えるための少なくとも一種の識別手段を有するプローブ担持粒子が分散された分散液が収容されていることを特徴とする。前記識別手段としては、プローブ担持粒子の色、形状および粒子径が挙げられる。

#### 【0040】

(i) また、本発明のバイオチップは、全ての前記識別手段におけるプローブ識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収

納された複数のプローブ担持粒子について、前記プローブ識別情報が同一であることを特徴とする。

【0041】

(ii) また、本発明のバイオチップは、全ての前記識別手段におけるプローブ識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、前記プローブ識別情報が異なっていることを特徴とする。

【0042】

(iii) また、本発明のバイオチップは、少なくとも一種の前記識別手段におけるプローブ識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、その全ての識別手段における前記プローブ識別情報の構成が同一であることを特徴とする。

【0043】

(iv) また、本発明のバイオチップは、少なくとも一種の前記識別手段におけるプローブ識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ担持粒子について、その少なくとも一種の前記識別手段における前記プローブ識別情報の構成が異なっていることを特徴とする。

【0044】

本発明のバイオチップの操作方法は、上記のバイオチップの容器に收容された溶液中でウエルを上下させることにより、当該容器内の溶液と、ウエル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることを特徴とする。

【0045】

また、本発明のバイオチップの操作方法は、上記のバイオチップの容器に收容された溶液の界面を上下させることにより、当該容器内の溶液と、ウエル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることを特徴とする。

【0046】

上記の操作方法では、例えば、前記容器内の溶液と、ウエル内のプローブ担持粒子および／または溶液とを接触させることにより、バイオチップ内の内容物の混合、拡散、反応、分離または洗浄を行う。前記バイオチップの各ウエルには、同一もしくは異なる被検体が投入される。

【0047】

本発明の被検体中の標的物質とプローブとの反応方法は、以下の(1)～(3)の工程を含むことを特徴とする：

(1) 前記ウエルを収納する容器を備えるバイオチップのウエルに、上記(i)～(iv)いずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウエルに収納する工程；

(2) 前記バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；

この工程(2)において、前記容器に被検体を收容し、次いで該容器にウエルを浸漬させ、ウエル内の被検体を含む溶液の界面の高さを、前記フィルターの上面から前記粒子の粒子径+10 $\mu$ m以上の高さで且つウエル上部開口から該溶液が溢れ出ない範囲内の高さにして、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とすることが好ましい。

【0048】

また、第一のフィルターが底部に設けられるとともに、ウエルを挟んで第一のフィルターとは反対側に第二のフィルターを備えるバイオチップを用い、工程(2)において被検体を含む溶液を少なくとも第一のフィルターの上面から前記第二のフィルターの上面まで浸漬して当該被検体と全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とすることが好ましい。

(3) バイオチップの容器に收容された前記溶液中でウエルを上下させるか、あるいはバイオチップの容器に收容された前記溶液の界面を上下させることにより被検体中の標的

物質とプローブとの反応を行う工程。

【0049】

本発明の被検体中から標的物質をB/F分離する方法は、以下の(1)～(4)の工程を含むことを特徴とする：

- (1) 上記したウエルを収納する容器を備えるバイオチップのウエルに、上記(i)～(iv) いずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウエルに収納する工程；
- (2) 前記バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；
- (3) 前記溶液の界面の高さを、ウエル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウエル内から除去する工程；および
- (4) 洗浄液をバイオチップのウエルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウエルに循環させて該バイオチップのウエル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウエル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程。

【0050】

また、第一のフィルターが底部に設けられるとともに、ウエルを挟んで第一のフィルターとは反対側に第二のフィルターを備えるバイオチップを用いることができ、この場合、工程(2)において被検体を少なくとも第一のフィルターの上面から前記第二のフィルターの上面まで浸漬して当該被検体と全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とするとともに、工程(4)において洗浄液を前記第二のフィルターの上面まで浸漬してウエルに循環させて、該バイオチップのウエル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウエル外へ排出させることが好ましい。

【0051】

本発明の被検体中の標的物質の分画分離方法は、以下の(1)～(5)の工程を含むことを特徴とする：

- (1) 上記したウエルを収納する容器を備えるバイオチップのウエルに、上記(i)～(iv) いずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウエルに収納する工程；
- (2) 前記バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；
- (3) 前記溶液の界面の高さを、ウエル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウエル内から除去する工程；
- (4) 洗浄液をバイオチップのウエルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウエルに循環させて該バイオチップのウエル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウエル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程；および
- (5) 前記バイオチップのウエルの下端に設けられた凹部または凸部と嵌合する凸部または凹部を有する容器と該バイオチップとを嵌合させ、次いで分離剤溶液を投入して、これにより前記粒子から被検体中の標的物質を分離し、前記容器内における前記ウエルに対応する区画へ移動させる工程。

【0052】

本発明の被検体中の標的物質とプローブの相互作用の検出・同定方法は、以下の(1)～(6)の工程を含むことを特徴とする：

- (1) 上記したウエルを収納する容器を備えるバイオチップのウエルに、上記(i)～(iv) いずれかに記載のチップとなるように特定の粒子をウエルに収納する工程；
- (2) 前記バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程；
- (3) 前記溶液の界面の高さを、ウエル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウエル内から除去する工

程;

(4) 洗浄液をバイオチップのウエルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウエルに循環させて該バイオチップのウエル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウエル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程;

(5) ウエル内の粒子をフィルターの細孔に位置させる工程;および

(6) 前記粒子に担持されたプローブと被検体の標的物質との反応または相互作用を検出・同定する工程。

#### 【0053】

この工程(6)において、工程(6)において、粒子ごとに、粒子のプローブ識別情報と前記粒子に担持されたプローブと被検体の標的物質との反応または相互作用の情報の双方を検出することが好ましい。

#### 【0054】

また、工程(6)において、各ウエルごとの粒子について、前記粒子に担持されたプローブ識別情報を識別し、次いでプローブと被検体中の標的物質との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の状態情報に基づき、ウエル単位での相互作用情報を算出することが好ましい。

#### 【発明の効果】

##### 【0055】

本発明によれば、

- ・高効率に短時間で被検体中の標的物質とプローブが反応し、
- ・B/F分離効率が高く、
- ・高感度での定量検出が可能であるバイオチップが提供される。

##### 【0056】

さらに、本発明によれば、当該バイオチップを用いた、

- ・一被検体から少なくとも一種類以上の標的物質の分離分画方法
  - ・多数の被検体から同時並行に少なくとも一種類以上の標的物質を分離分画する方法
  - ・一被検体からの少なくとも一種類以上の標的物質のアッセイ方法
  - ・多数の被検体からの同時並行に行う少なくとも一種類以上の標的物質のアッセイ方法
- が提供される。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0057】

以下、図面を参照しながら本発明を具体的に説明する。図1は、本発明の一実施形態によるバイオチップが備えるウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

##### 【0058】

同図に示したように、このウエル16は、細孔19が形成されたフィルター18が底部に設けられている。このフィルター18は、被検体あるいは被検体を溶解もしくは分散した媒体などの液体を通過させるとともに、ウエル16内に収納された、被検体と相互作用するプローブ担持粒子が外側へ排出しないように構成されている。

##### 【0059】

本発明では、フィルター18に均一な孔径を有するストレートな細孔が、均一な孔間隔で形成されている。本明細書において、「均一な孔径」とは、孔径の誤差がCV(Coefficient of Variation)値で10%以下であることを意味する。孔径の誤差がCV値で10%以下であるような細孔は、後述する方法によって作製可能であり、ウエル16内に収納されるプローブ担持粒子と孔径との寸法差を僅少とすることができる。

##### 【0060】

従来から使用されているメンブレンフィルター等の孔径には10倍程度のばらつきがあり、例えば0.2 $\mu$ m孔径のフィルターを使用する場合では、確実に濾過できる粒子径は5 $\mu$ m程度となる。これと比較して、上記のように均一な孔径を有するフィルターを使用した場合には、フィルターの細孔の孔径は非常に均一であるため、粒子径と孔との差を小

さくすることができ、そのために孔径をより大きくすることができ、フィルターの濾過性を向上するとともに、濾過圧力が低減される。

#### 【0061】

このように均一な孔径を有するフィルターにおいて、その細孔の孔径は、特に限定されないが、通常  $0.01\mu\text{m} \sim 100\mu\text{m}$ 、好ましくは  $0.1\mu\text{m} \sim 50\mu\text{m}$ 、より好ましくは  $0.5\mu\text{m} \sim 15\mu\text{m}$  である。

#### 【0062】

また「均一な孔間隔」とは、孔間隔の誤差が CV (Coefficient of Variation) 値で 15 % 以下であることを意味する。孔間隔には特に限定はないが、孔間隔があまりに狭いとフィルターの強度が弱くなり、また孔間隔があまりに広いと開口率が下がることから、通常は孔径の 2 倍以下であり、且つ  $0.5\mu\text{m} \sim 10\mu\text{m}$  であることが好ましい。なお、「孔間隔」とは隣接する各孔の間における孔が空いていない部分の最短距離のことである。

#### 【0063】

また、本明細書において、「ストレート」な細孔とは、細孔が途中で分岐することなく形成されていることを意味する。例えば、一方のフィルター表面に形成された開口の中心から他方のフィルター表面への垂線と、この他方のフィルター表面に形成された開口の中心から前記一方のフィルター表面への垂線とがずれていても、圧力損失という点ではそれほど遜色がないため、このような細孔であってもよいが、当該垂線が実質的にずれていない細孔であり且つフィルターの一次側（上面側）の孔径が二次側（下面側）の孔径以上であることが粒子の孔への静置という点では特に好ましく、例えば図 2 (a) ~ (c) に示したような形状が挙げられる。貫通方向と垂直な細孔断面の形状は特に限定されないが、メニスカスを最小限にするため鈍角形状あるいは円形であることが望ましい。

#### 【0064】

このようにストレートな細孔とすることにより、フィルターに形成する細孔長さが最小となるため細孔壁との接触面積が減少し、濾過に伴う圧送抵抗を最小限とすることができる。

#### 【0065】

また、プローブ担持粒子がフィルターの一次側に堆積して目詰まりを起こした場合であっても粒子がフィルターの内部に入り込まずにフィルター表面に留まり（いわゆる完全閉塞モデルとなる）、フィルター二次側からのフラッシングによって粒子をフィルター表面から一次側へ容易に分散させることができる。このため、フィルターの目詰まりを再度解消して再生させることができ、フィルターの寿命を延ばすことができる。

#### 【0066】

以上のように、フィルターに均一な孔径を有するストレートな細孔を、均一な孔間隔で形成することによって、プローブ担持粒子は一次側の開口上に配列され、必要に応じて被検体などの液体を二次側からフラッシングして粒子を一次側へ分散させることも可能であり、被検体とプローブ担持粒子との反応や検出を容易に行うことができる。

#### 【0067】

さらに、プローブ担持粒子がフィルターの二次側に排出されることが許されず、粒子を 100 % 捕捉する必要がある場合には、フィルターの孔径を粒子の最小径よりも大きくするように粒子サイズなどを考慮することで、透過係数と濾過効率を低下させることなく 100 % の粒子捕捉が可能である。

#### 【0068】

一般的な濾紙やメンブレンフィルターは孔径、孔間隔が均一ではなく、また、孔自体が三次元的に入り組んだ構造をしており、フィルター内部にフィルター表面よりもさらに細かい孔が存在する。このため、濾液中に含まれる粒子の一部はフィルター内部の孔に捕捉され、中間閉塞モデルと称される目詰まりを生じ、この目詰まりを解消するために二次側から液体を送り込みフィルターに存在する粒子をフィルター内から一次側に取り出す際に、フラッシングによる効果が充分ではなく全ての粒子はフィルターから一次側に取り出せず、フィルター内に閉じ込められて検出用に使用される粒子が減少する。さらに、フィルタ



一の粒子捕捉効率は確率的であり、100%の捕捉効率とするためには「ふるい対象となる粒子径分布の最小粒子径>フィルター径分布の最大径」となるフィルターを選択する必要があるが、これによって透過係数と濾過効率が低下する。

#### 【0069】

フィルターは、細孔を有する各種の形態のもので形成することができる。具体的には、金型によるプレス、織布、フィルムにレーザーもしくは中性子線で穿孔して形成したフィルター、樹脂もしくは金属薄膜に傷をつけて張力により孔を拡大したもの、基材をフォトエッチングにより穿孔したもの、樹脂成型によるものなどが挙げられる。

#### 【0070】

前述したような、均一な孔径を有し、均一な孔間隔で形成された細孔を有するフィルターは、例えばフォトリソグラフィによる方法で作製することができ、所定の有機あるいは無機のフィルムにレジストを塗布し、フォトエッチングすることにより所定の孔を開けてフィルターを形成する。所定の機械的強度を有する膜厚と所定の孔径を確保するためには、高アスペクトのエッチングが必要であるが、異方性エッチングによりこれを行うことができる。

#### 【0071】

また、エキスパンドメタルによる方法で作製することも可能である。例えば、厚さ30 $\mu\text{m}$ のステンレス箔に、金型にて千鳥状に切れ目を入れ、これを押し広げてひし形状の貫通孔を形成する。この方法によれば、ひし形孔の最大距離が30 $\mu\text{m}$ であり、開口率が60%程度のフィルターが得られる。次いで、得られたエキスパンドメタルフィルターを、さらに凸金型でプレス処理して所定の凹面を形成することによって、一体に形成された複数のウエルを得る。あるいは、別途に樹脂もしくは金属にて、ハニカムあるいは丸型などの上下が貫通したウエル群を作製し、ウエル群の底面に熱可塑性樹脂溶液を塗布乾燥して、加熱したフィルターとウエルとを熱接着することによって上記のエキスパンドメタルフィルターとウエル群とを接着してウエルを形成する。

#### 【0072】

また、後述するように、ウエル側部とフィルターとを樹脂にて一体成型する方法で作製することもできる。

#### 【0073】

フィルターを形成する材料としては、濾過抵抗を減少する等の点から、ウエルに收容される溶液と親和性の高い材料、具体的には、溶液が水系の場合は親水性の材料、溶液が油性の場合は親油性の材料を選択することが望ましい。

#### 【0074】

親水性の有機材料としては、例えばポリエチレンビニル樹脂、架橋ポリビニルアルコール樹脂、ポリグリコール酸樹脂、ポリアミド樹脂、ポリイミド、セルロースアセテート樹脂、トリアセチルセルロース、硝酸セルロース樹脂、エポキシ樹脂、2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとメタクリレートとの共重合体などの各種アクリレートの共重合体などが挙げられる。

#### 【0075】

親油性の有機材料としては、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメチルメタアクリレート樹脂、液晶ポリマー、ポリカーボネート、ポリアミド樹脂、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、シクロオレフィン、ポリメチルペンテン、ポリアリレート、ポリサルホン、ポリエーテルサルホンなどが挙げられる。

#### 【0076】

また、無機材料としては、例えば鉄、ニッケル、銅、亜鉛、アルミニウム、シリコン、チタン、タンタル、マグネシウム、モリブデン、タングステン、ロジウム、パラジウム、銀、金、白金、ステンレス、真鍮、黄銅、青銅、燐青銅、アルミ銅合金、アルミマグネシウム合金、アルミマグネシウムシリコン合金、アルミ亜鉛マグネシウム銅合金、鉄ニッケル合金等の金属；シリカ、アルミナ、チタニア、ジルコニア、酸化タンタル等の金属酸化



物; SiN、TiN、TaN等の金属窒化物; SiC、WC等の金属炭化物; ダイヤモンド、グラファイト、Diamond Like Carbon(DLC)等の炭素材料; ソーダガラス、ホウ珪酸ガラス、パイレックス(R)、石英ガラス等のガラスなどが挙げられる。

#### 【0077】

また、親油性材料の表面に、プラズマ処理、コロナ処理あるいはイオン処理などを施して、ヒドロキシル基やカルボキシル基などを形成してもよい。また、メッキなどにより表面に親水性の金属あるいは金属酸化物を形成してもよく、あるいは、例えば2-メタクリロイルオキシエチルホスホリルコリンとメタクリレートとの共重合体、ポリエチレングリコール誘導体などの親水性材料をコーティングしてもよく、あるいはグリシジルメタクリレートを塗布した後にエポキシ基を開環してもよい。

#### 【0078】

ウエル側部からなるウエル孔の形状は、特に限定されないが、メニスカスを最小限にするために鈍角あるいは円型が望ましい。

#### <補強用リブ部>

上述したような底部にフィルターを設けたウエルでは、フィルターの厚さが薄いために、ウエルの孔径が大きい場合や、あるいはフィルターの開口率が大きい場合にはウエル底部の強度が充分ではなく、使用時などにフィルターが破損もしくは損傷し易くなる。そこで、このような場合には、フィルターの上面側または下面側に、リブ状の補強手段を設けてウエル底部を補強することが望ましい。

#### 【0079】

図3は、このような補強用リブ部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。図3(a)では、フィルター18の下面側に突条部位を有するリブ部23が設けられている。図3(b)では、フィルター18の上面側にリブ部23が設けられている。

#### 【0080】

図4は、補強用リブ部23をフィルター18の面上に設けた様子を模式的に示した上面図である。同図に示したように、その形状は複数の貫通孔29が形成された一体形状として、貫通孔29の間を連続したリブとすることが好ましい。貫通孔29の貫通方向とほぼ垂直な断面は、円形、矩形、六角形のような多角形など特に限定されないが、メニスカス現象を低減するために円形かあるいは六角形などの鈍角多角形が好ましい。図5に、実際にフィルター上に補強用リブ部を設けたウエル底部の電子顕微写真を示す。

#### 【0081】

補強用リブ部のリブ高さは、ウエルの底面積やリブの材質にもよるが、好ましくは10 $\mu$ m~2000 $\mu$ m、より好ましくは100 $\mu$ m~1000 $\mu$ mである。

#### 【0082】

このように補強用リブ部を設けることによりフィルターの機械的強度が向上し、その結果、フィルターが薄くても機械的圧力に対する耐性が得られるとともに、フィルターの孔の長さが短いものを使用することができるため、濾過圧力をより低減することができる。

#### 【0083】

補強用リブ部は、図3のようにフィルターと別途に形成して接合するか、あるいは図6(a)~(c)に示したように、フィルター18の細孔をリブあるいはウエル材料をアディティブ法等で潰して埋めることにより接合するようにしてもよい。ウエルの側壁20は、フィルター18を貫通させてその貫通した下端部を補強用リブ23の一部とすることができる。

#### 【0084】

別途に形成された補強用リブ部もしくはウエル側壁をフィルターと接合する場合、接着剤を使用せずに直接接合することが好ましい。直接接合は、フィルターと補強用リブ部もしくはウエル側壁を積層法により積み上げて形成する方法など、後述する方法で行うことができる。

#### 【0085】

この方法では接着剤等を介さずに直接接合されているため、濾過に際して補強用リブ部

もしくはウエル側壁とフィルターとの界面が剥離したり、あるいは界面に濾過対象液が入り込むなどの問題点が解消される。特にウエルの開口径が小さく、ウエル数が多いチップの場合には、ウエル側壁とフィルターとの接合は幾何級数的に困難となり界面で液漏れし易くなるが、接着剤を介することなくウエルとフィルターとを直接接合することにより液漏れの懸念が解消される。また、補強用リブ部はフィルターの機械的な補強材として設置されており、フィルターとの接着が不十分の場合には機械的強度の向上が期待できない。しかし、このように接着剤を介さずに直接接合することでフィルターとリブとが十分な強度で一体化し、機械的強度が向上する。

#### 【0086】

また、図7に示したように、補強用リブ部をフィルターと同一材料で連続形成することも可能であり、一体形成されているため強度的に望ましい態様である。ここで同一材料とは元の素材が同一であればよく、例えば金属シリコンの一部を酸化して酸化シリコンとしたシリコンシリカ材料、金属シリコンの一部を炭化してSiCとしたシリコン/SiC材料等も、同一材料とみなされる。ウエルの側壁も同様にしてフィルターと連続形成することができる。その製造方法としては、あらかじめフィルターを作製するに際してウエルやリブ部については穿孔せずに、次いでウエルやリブを形成する際にその部分に位置合わせしてウエルやリブを形成するなどして、フィルターと補強用リブ部もしくはウエル側壁を同一素材から切削あるいはエッチングにて作製する方法など、後述する方法で行うことができる。

#### 【0087】

また、リブ23あるいはウエル側壁20の部分におけるフィルター18の細孔は必要に応じて無くすることもできる。具体的には、フィルター18の作製時に予め細孔の無い部分を形成しておき、リブ23あるいはウエル側壁20をこの細孔が無い部分に位置合わせして接合するか、あるいはリブ23とフィルター18をアディティブ法により作製する場合には、同時に穴埋めする方法で行うことができる。

#### 【0088】

図8に示したウエルでは、フィルターの下面に前記補強用リブ部23を設けるとともに、この補強用リブ部23におけるウエル側部20の下端側の位置に、別途の受け皿容器に設けられた凸部と嵌合する位置合わせ用の凹部27が形成されている。凹部27の具体的な形状は別途の受け皿容器に設けられた凸部に応じて適宜の形状とすることができる。すなわち、ウエルに形成された凹部27は所定ウエル内の溶液を別の受け皿容器の所定ウエルに移し替える際に、受け皿容器のコネクターとなるメス型部分の溝であり、受け皿容器のオス型部分と嵌合させることで、ウエル内の溶液を受け皿容器の所定部分に漏らすことなく移動させることが可能となる。位置合わせ用の凹部の溝形状は、メス型として受け皿容器に設けられたオス型の凸部に嵌合できるものであれば特に限定されない。

#### 【0089】

特に、移動溶液を収容したウエルと、受け皿ウエルがそれぞれ多数存在する場合に、全ての対応ウエルの溶液を同時並行で移し変える際に有効である。

#### 【0090】

これらの溝を有するリブは後述する各種の製造方法により一般のリブと同様に作製することができる。凹部27を有するリブの幅や形状は、特に限定されないが、リブの幅は好ましくは100 $\mu$ m以上、より好ましくは200 $\mu$ m以上5mm以下、さらに好ましくは300 $\mu$ m以上1000 $\mu$ m以下であることが望ましい。リブの幅が100 $\mu$ m未満の場合には、受け皿容器の凸部と嵌合させることが困難であり、リブの幅が5mmを超える場合には、所定面積中におけるウエル部分の占める部分が過度に小さくなる。

#### 【0091】

上述した位置合わせ用の凹部は、補強用リブ23の一部であるかどうかに関わらず、ウエルの側部20の下端に形成される。このウエルの下端に形成される凹部は、逆に凸部であってもよく、その場合は対応する受け皿容器に嵌合用の凹部を形成する必要がある。

#### 【0092】

図9に示したウエルでは、ウエルの底部上面に、その周縁から所定の幅で、フィルター18の細孔19が形成されていない無孔部28が設けられている。

【0093】

この無孔部28の所定の幅としては、ウエル底部の周縁から好ましくは $5\mu\text{m}$ ～ $50\mu\text{m}$ 、より好ましくは $10\mu\text{m}$ ～ $30\mu\text{m}$ である。この無孔部が無く、リブやウエルの壁際まで細孔が設けられた場合には、粒子が壁際に滞留したり、あるいはさらに堆積するなどの現象を起こす場合がある。無孔部を設けることで、溶液はウエルやリブの壁際から中心部に移動する層流を起こし、粒子がウエルやリブの壁際に滞留あるいは積層することが防止される。さらに、後述する光学的検出に際して、壁際に粒子が無いために、ウエル壁からの光反射により壁際の粒子の検出が阻害されることを防止することができる。

【0094】

この無孔部を有するウエルは、あらかじめ特定領域に無孔帯を設けたフィルターを作製し、ウエルあるいは補強用リブを無孔帯の部分に位置合わせして接合する方法、あるいは無孔帯にウエルあるいは補強用リブをアディティブ法等で積み上げる方法などによる方法で作製することができる。

【0095】

以下に、上述してきたウエルの各種製法について説明する。

【0096】

第一の方法は、フィルターなどを電気メッキにより積み上げる方法である。本方法では、あらかじめ導電性処理が為された基板を用意し、その上にレジスト等でパターンニングを行い、電気メッキしない部分をレジストで保護して、基板とメッキ溶液との間に電流を流すことにより基板の所定部分にのみ金属あるいはイオン性のポリマー材料を形成する。

【0097】

まず、導電性処理が為された基板を用意し、その上にレジストを塗布する。これらのレジストを導電性基板の上に膜形成した後、フォトマスクを用意してUV光にて露光現像し、導電性シートの上にフィルターの反転パターンであるレジストのポストを形成する。これらの方法によるパターン限界はレジストの解像度に依存するが、例えばTHB-110N（商品名：JSR株式会社製）を使用することで、パターンピッチで $5\mu\text{m}$ 、アスペクト比で2のレジストポストを作製することができる。

【0098】

次いで、これらのポストの間に、電気メッキ法によって金属あるいはイオン性の樹脂を交流あるいは直流の電流を流して電氣的に充填する。電気メッキ法により充填される金属材料としては、金、ニッケル、銅、鉄、鉄ニッケル合金等が挙げられる。ニッケル電鍍のためのメッキ液としては、スルファミン酸ニッケル浴（スルファミン酸60%液700g/l、臭化ニッケル5g/l、硼酸35g/lの混合液、浴温 $50^{\circ}\text{C}$ ）などが用いられ、銅電気メッキ液としては、硫酸銅浴（硫酸銅200g/l、硫酸60g/l、塩素イオン30mg/lの混合液、浴温 $30^{\circ}\text{C}$ ）などが用いられ、鉄電気メッキ液としては、スルファミン酸鉄浴（スルファミン酸鉄400g/l、スルファミン酸アンモニウム30g/l、ホルマリン100mg/lの混合液、浴温 $46^{\circ}\text{C}$ ）などが用いられる。例えば、スルファミン酸ニッケル浴の場合、電圧6V、電流密度 $3\text{A/dm}^2$ で10から20分程度直流を流すことによって厚さ $5\mu\text{m}$ の電気メッキ物を得ることができる。

【0099】

また、電気メッキ法により充填される樹脂材料としては、エポキシ樹脂、アクリル樹脂、ポリイミド樹脂等が挙げられる。これらの樹脂としては、例えば株式会社 シミズ エレクトロコート社のもの、日本ペイント株式会社のパワートップUなどのアクリル樹脂などが使用可能である。

【0100】

また金属、樹脂何れの場合も各種の添加剤を添加することができ、例えばシリカ、チタニア、アルミナ等の金属酸化物微粒子、フッ素樹脂微粒子などを添加することで、形成された膜の化学的な性質を変化させることができる。

【0101】

次いで、樹脂電鍍の場合には、最後に約200℃の加熱により樹脂をキュアーすると同時にレジストを焼成除去する。電気メッキ法の場合には、例えばレジストストリッパーTHB-S1（商品名：JSR株式会社製）によりレジストを除去する。

#### 【0102】

このようにしてフィルターを作製した後、ウエルあるいは補強用リブ部を、フィルターの形成方法と同様に、さらに電気メッキ法により形成することができる。すなわち、上記と同様にフィルターの上にレジスト膜を形成し、フォトリソグラフィ、電気メッキ法材料の充填を行う。この場合、一般にウエルの高さはフィルターの厚さ以上であるためにレジスト膜も厚くなり、このためレジストはドライフィルムレジストを積層して使用することが好ましい。一般に、線幅と厚さのアスペクト比が2を超えるメッキ物の形成は1回では困難であり、このような場合にはフォトリソグラフィと電気メッキ法によるメッキ物の形成を数回繰り返すことで所定の高さのウエルとする。

#### 【0103】

第二の方法では、フィルター、ウエル、補強用リブ部の少なくともいずれかをエッチング方法により作製する。エッチングの対象物は、フィルターを形成できるものであれば、金属、金属酸化物、有機物など特に限定されないが、特に好ましいのは、機械的強度が高い材料であり、具体的には、例えば液晶ポリマー、ポリカーボネート、ポリアミド樹脂、ポリイミド、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、ポリアリレート、ポリサルホン、ポリエーテルサルホンなどのエンジニアリングプラスチック；鉄、ニッケル、銅、亜鉛、アルミニウム、シリコン、チタン、タンタル、マグネシウム、モリブデン、タングステン、ロジウム、パラジウム、銀、金、白金、ステンレス、真鍮、黄銅、青銅、燐青銅、アルミ銅合金、アルミマグネシウム合金、アルミマグネシウムシリコン合金、アルミ亜鉛マグネシウム銅合金、鉄ニッケル合金などの金属；シリカ、アルミナ、チタニア、ジルコニア、酸化タンタルなどの金属酸化物；SiN、TiN、Ta<sub>2</sub>Nなどの金属窒化物；SiC、WCなどの金属炭化物；ダイヤモンド、グラファイト、Diamond Like Carbon(DLC)などの炭素材料；ソーダガラス、ホウ珪酸ガラス、パイレックス（商標）、石英ガラスなどのガラスが挙げられる。

#### 【0104】

エッチングは通常の方法によって行うことができる。但し、アスペクト比が余りに大きいエッチングはその孔径や形状が不均一になる可能性があり、実質的には、通常の化学エッチングで得られるアスペクト比としては5以下、好ましくは3以下である。但し、このアスペクトの範囲で積極的に逆テーパ形状が形成されたフィルターを使用することで濾過性の良好なフィルターを得ることもできる。

#### 【0105】

また、ウエルやリブ形状をエッチングで作製する場合には、アスペクト比が5以上となることが望ましく、材料の異方性エッチングによりアスペクト5以上のエッチングを行うことができる。例えば、シリコンなどの単結晶材料でKOH水溶液やエチレンジアミン・ピロカテコール(EDP)、4メチル水酸化アンモニウム(TMAH)などのエッチング液に対して大きな結晶依存性を示すことを利用する。シリコンの場合は(111)面のエッチング速度が他の結晶面に対して極端に遅く、(110)面を表面としたシリコンウエハを用いてマスク材の開口のある辺を(111)面方向と揃えて化学的エッチングを行うことでアスペクト100程度のエッチングを行うことが可能である。これらの方法は、精密工学会、編著：「ナノスケール加工技術」、日刊工業新聞社(1993)に記載されている。

#### 【0106】

また、必要に応じて、プラズマを用いた反応性イオンエッチング(RIE)を行うことができる。例えば、SF<sub>6</sub>にフロン系の塩素ガスを含むガスによって基板に垂直な異方性エッチングを行うことができる。これらの方法は、「02最新半導体プロセス技術」、プレスジャーナル社(2001)に記載されている。

#### 【0107】

第三の方法では、フィルターを金属の陽極酸化により作製する。対象金属としては、ア

ルミニウム、シリコンなどが挙げられる。以下、アルミニウムを例として具体例を示す。まず、アルミニウムの板を用意する。アルミニウム板は場合により片側にウエルの深さよりも約 $100\mu\text{m}$ 程度の浅い凹面をあらかじめ形成しておくが好ましい。例えばウエルの深さを $5\text{mm}$ 、フィルターの厚さを $20\mu\text{m}$ とする場合は、アルミ板の厚さが $5.0\text{mm}$ であり $4.9\text{mm}$ の凹面を持つアルミ板を用意する。凹面内部に、陽極酸化工程中の機械的な強度維持を目的として、モンタン酸ワックス、ポリエチレンワックス（クラリエン株式会社製）などのワックスなどの充填物を充填しておき、フィルター形成の後に熱溶融除去することも可能である。

#### 【0108】

次いで、これらの凹面とは反対側に、フィルターの孔を空けるための先導孔を形成する。この先導孔はピッチが $1\mu\text{m}$ 以下、好ましくは $0.5\mu\text{m}$ 以下であり、深さが $0.1\mu\text{m}$ 以上であることが好ましい。これらの先導孔は、金型を用いたスタンピングによる方法の他に、レジストによるフォトリソグラフィでも得ることができる。

#### 【0109】

次いで、これらのアルミをシュウ酸あるいは硫酸溶液中で電圧を掛けながら陽極酸化する。その具体的な方法は、特開2003-11099号公報に記載されている。陽極酸化によりフィルターを作製した後、アルミに形成された凹面の底面と、フィルター孔とを貫通させるために、アルミウエルの凹面にリン酸、フッ酸、硝酸などの強酸あるいはこれらの混酸あるいは塩化第二鉄を滴下する。例えば塩化第二鉄の場合は $50^\circ\text{C}$ 、20時間エッチングすることによりウエル底面をフィルター孔面まで貫通させることが可能である。これらの方法は応用物理 第69巻 第5号（2000）、特開2000-258650号公報などに記載されている。この陽極酸化による方法によれば、孔径が $5\sim450\text{nm}$ 、アスペクト比約100、大きさが $5\sim10\text{mm}$ 程度のフィルターを作製することが可能である。

#### 【0110】

第四の方法では、フィルターを樹脂のナノプリントで作製する。まず、ナノプリントによるフィルターを形成するためのベース板を用意する。ベース板は平滑な板か、あるいはウエル孔とするためにあらかじめ約 $100\mu\text{m}$ 程度の底部厚さを残した凹面を有する板でもよい。この凹面も上記と同様にワックスなどを充填してもよい。

#### 【0111】

あらかじめナノプリント用の型を用意しておく。型の製造方法は特に限定はないが、孔径が数十 $\mu\text{m}$ 以下である孔を設けた型は製造方法が限定され、一般にはシリコンの結晶異方性を利用した異方性エッチングやX線リソグラフィによる方法によるいわゆるMEMS（Micro Electro Mechanical System）技術により得られる。あるいはMEMS技術により作成された型を元に金属メッキをした反転型を使用することも可能である。この様にして用意された型は、プレス装置に装着される。このナノプリント装置としては、株式会社テクトリアのNPHT-1などが挙げられる。

#### 【0112】

ナノプリントによって成型する樹脂としては、流動性の良好な樹脂が好ましく、液晶ポリマーや結晶性のナイロン樹脂などが好適である。あるいはエポキシ樹脂やウレタンアクリレートなどのオリゴマーをプレスと同時に光硬化あるいは熱硬化させてもよい。エポキシ樹脂やウレタンアクリレートは液状の樹脂の他にプリプレグフィルム状のものも使用可能である。

#### 【0113】

これらのナノプリントによりプレス成型されたフィルターは型抜きせずに底面に皮状の樹脂を残す方が成型の失敗が少なく、型が抜きやすい。また型抜きの容易性や型の損傷を考慮すると形成する孔はアスペクト比で10以下が好ましく、より好ましいのは5以下である。

#### 【0114】

また、成型時に積極的に皮部分をウエル部分として残し、別途にこの皮部分を掘削ある

いはエッチングにてウエル形成することが可能である。フィルム残渣をウエルとして利用する場合は、具体的にはベース板より樹脂残渣シートを剥離した後、剥離部分をドリル穿孔するか、あるいはフォトエッチングを行うことによりフィルター部分まで貫通孔を空けることが可能である。あるいは途中までを機械的に穿孔した後、最後の数十～数百 $\mu\text{m}$ を酸やアルカリなどによりエッチング除去することも可能である。

#### 【0115】

第五の方法では、リブあるいはウエルを光造型で作製する。先ず、上述した電鍍、エッチング、金属の陽極酸化、樹脂のナノプリントのいずれかの方法によりフィルターを作成する。あるいはプレス加工、エキスパンドメタル法により作製されたフィルターなどを使用することも可能である。これらのフィルターをベース板として、あるいはフィルターを別のベース板の上に固定してその上にウエルあるいはリブを形成する。

#### 【0116】

具体的には、図10(a)に示したようにベース板71にフィルター18を固定して、光造形機バス72へ設置し、ベース板71を支持するエレベーター73を下降させ、フィルター18側にUV硬化樹脂を1層分流し込み、UV光を照射して1層分の樹脂層のリブ部23(あるいはウエル部分)を硬化させる。エレベーター73の移動とUV照射を繰り返して所定の層まで積層硬化させた後、ベース板71を含む積層体をUV樹脂液から取り出し、未硬化部分を洗浄してベース板71を外しポストキュアしてリブあるいはウエル付きフィルターを得る。

#### 【0117】

この光造型による方法において、フィルター18を下にしてその上に閉じられた形状のリブ部23あるいはウエルを光造形で形成する場合、これらの内部における未硬化の樹脂の排出が困難であり、内部の樹脂が表面張力で盛り上がるためにリブあるいはウエルの形状が乱れる可能性がある。このため、図10(b)に示したように、フィルター18を上にしてその下側に光造形によりリブ部23あるいはウエルを形成成長させる方法が好ましい。この方法を行うための光造型装置は株式会社デンケンよりSLP-4000として装置が市販されており、また造型の製造受託を行っている。また、現在の光造型は主としてレーザー照射により光硬化性樹脂の硬化を行っているが、上記の場合には照射パターンは一律であり、フォトマスクを通して光照射を行いUV樹脂を積層することも可能であり、造型時間を短縮することができる。

#### 【0118】

第六の方法では、ウエルあるいはリブとフィルターとを熱接着で接合する。例えば、フィルター部分を加熱してウエルあるいはリブを非加熱の状態で作成させ熱接着させる。フィルター部分は熱伝導率の良い金属あるいはセラミックスで作製し、リブは熱可塑性の材料を成型加工で作製する。フィルターの端面を加熱材料と接合させ、熱導電性を利用してフィルターを加熱しウエルとリブを熱接着する。

#### 【0119】

あるいは、電磁誘導加熱または誘電加熱を利用する。ここで使用されるウエルあるいはリブは、電磁誘導加熱あるいは誘電加熱で発熱しない低誘電率の材料である熱可塑性の樹脂で作製する。ここで使用される材料の誘電率は3.5以下であることが好ましい。具体的な樹脂材料としては、例えばポリエチレン、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリメチルメタアクリレート樹脂、液晶ポリマー、ポリカーボネート、ポリアミド樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、シクロオレフィン、ポリメチルペンテン、ポリアリレート、ポリサルホン、ポリエーテルサルホンなどが挙げられる。

#### 【0120】

上記のような樹脂材料を何らかの方法で成型してあらかじめウエルあるいはリブ形状にする。ウエルは、フィルターに載置する複数のウエルを一体に全て作製しておくことが望ましく、その方法としては射出成型、プレス成型または異型押し出し成型によって複数のウエル孔の空いた連続パイプを作製してパイプを輪切りにする方法、板にドリルなどの方法で孔を空ける方法などが挙げられる。



## 【0121】

また、ここで使用されるフィルター材料は誘電加熱で加熱される材料が好ましく、誘電率が3.8以上であるものが好ましい。具体的には、例えば金、銀、ニッケル、銅、鉄、アルミニウム、チタン、シリコン、ステンレス、タングステン、モリブデンなどの金属；シリカ、アルミナ、チタニアなどの金属酸化物；SiNなどの金属窒化物；ソーダーガラス、ホウ珪酸ガラス、パイレックス（商標）、石英ガラスなどのガラスが挙げられる。あるいは、樹脂材料に無機材料のフィラーを混合したものをを用いてもよい。

## 【0122】

ウエルとリブとの間にフィルターを挟むなど、ウエルとリブとの少なくともいずれかとフィルターとを重ね、固定治具で固定し、あるいは樹脂ローラーなどで挟み込んで加圧して電磁誘導加熱あるいは誘電加熱させ、フィルター部分を発熱させてその熱によってウエルとリブとをフィルターに熱溶着する。電磁誘導あるいは誘電加熱の周波数としては、30kHzから300MHzが利用可能であり、好ましくは1~100MHzである。

## 【0123】

第七の方法では、フィルターとウエルを接着剤で接着する。予め接着剤をウエルの片側端面に塗布しておき、フィルターに貼り付け、必要に応じて加熱して接着する。あるいは、クラリアントジャパン L I C O W A X L Pなどのワックスをウエルに塗布し、フィルターを加熱して塗布冷却する方法で接着する。

## 【0124】

第八の方法では、フィルターのインサート成型によりウエルあるいはリブを作製する。インサート成型ではあらかじめ作成したフィルターを金型に挿入して、樹脂成型を行うことでフィルターと樹脂とを一体成型することが可能である。

## 【0125】

第九の方法では、フィルターとウエルとをそれぞれ磁性材料を用いて磁力により結合させる。例えば、フィルターかウエルのいずれかに強磁性体を用い、対応するウエルあるいはフィルターを磁石で構成し、磁石で結合することによりフィルター付きのウエルとすることができる。強磁性体としては、ニッケル、鉄などが挙げられ、磁石としてはフェライト、サマリウムコバルト磁石、ネオジウム系磁石、アルミニウムコバルト系磁石などが挙げられる。

## 【0126】

フィルターを磁石とする場合には、例えば平滑な銅、ニッケル、クロムなどの金と接着性の良い金属板の表面に、数十オングストロームの厚さで金蒸着を行い、次いでフォトリジストを塗布した後にフィルターの細孔を形成する部分にレジストを残したパターンニングを行う。次いで無電解フェライトメッキを行い厚さ1~20 $\mu$ mのフェライト層を形成した後、レジスト剥離液にてレジストを剥離し、最後に金蒸着層からフェライト層を剥がす。このフェライトメッキは、例えば日本応用磁気学会誌 Vol22, No9, 1998 1225-1232, 日本応用磁気学会誌 Vol 24, No4-2, 2000, 515-517の条件に準じて行うことができる。このようにフィルターを磁石として、例えば上述した電鍍ニッケルメッキによりウエルを作製し、両者を磁力により結合することでフィルター付きウエルが作製される。

## 【0127】

また、リブを磁石とする場合には、例えばフェライト、サマリウム系あるいはネオジウム系の磁性粉を樹脂バインダーにて混合してシートとしたプラマグシート（例えば株式会社マグエックス社製のもの）などにレーザーにて厚さ0.3mm~1mm程度の孔を開けた後、上述したニッケルフィルターと磁石により結合してフィルター付きウエルとすることができる。

## 【0128】

第十の方法では、機械的な嵌合によりウエルとフィルターとを結合させる。例えば、上述したニッケルの電気メッキ法により作製されたウエルのレジストを剥離する前に、さらにレジストを塗布パターンニングし、ウエル壁上面中心にウエルの幅よりも50 $\mu$ m~100 $\mu$ mだけ幅が狭いテーパ状のレジスト溝を設ける。この溝に、すずもしくは金などの軟

らかい金属、あるいは樹脂によるメッキを行い溝を充填する。次いで、レジストを剥離液にて剥離して、ニッケルのウエルの上に高さが幅とほぼ同等のすず、金あるいは樹脂などの櫛形の凸部が形成された凸構造のウエルを形成する。同時に、フィルター側にもレジストで同じ位置に、メス型となるような、上記の凸型と高さと同様にウエルの凸部よりも硬いニッケル、ポリイミド樹脂などの凹型形状を形成する。次いで、両者をロールなどで加圧することで機械的に嵌合して結合させてフィルター付きウエルを得る。また、逆にウエル壁上面に凹形状を設け、フィルター側に凸形状を設けるようにしてもよい。

#### 【0129】

本発明のバイオチップでは、第一のフィルターをウエルの底部に設けるとともに、その上側（ウエルを介して反対側）に第二のフィルターを設ける構成であってもよい。第二のフィルターは、上述した方法により得られた底部にフィルターを有するウエル内にプローブ担持粒子を収納し、さらに上述した方法により得られたフィルターを接着剤、磁力、機械的な嵌合、機械的なクランプにより接合する方法などにより設けることができ、これにより上下にフィルターを有するバイオチップを得ることができる。

#### 【0130】

本発明のバイオチップは、一体に形成された複数のウエルもしくは単一のウエルを有しており、このウエルにプローブ担持粒子が分散された分散液が收容される。ウエルに収納する粒子はフィルター細孔よりも大きい粒子径で、プローブ担持粒子の粒子径とフィルターの細孔の孔径は、 $\text{粒子径}/\text{孔径}=1.1\sim2.5$ であり、且つ、 $\text{粒子径}<\text{孔間隔}<\text{粒子径}\times 10$ 、より好ましくは $\text{粒子径}<\text{孔間隔}<\text{粒子径}\times 4$ である関係を有していることが望ましい。ここで、「孔間隔」とは隣接する各孔の間における孔が空いていない部分の最短距離のことである。

#### 【0131】

$\text{粒子径}/\text{孔径}$ が1.1未満である場合、粒子が細孔に入り込み、細孔から粒子が脱離できない確率が高くなる。 $\text{粒子径}/\text{孔径}$ が2.5を超える場合、粒子を含む溶液をフィルターを介して濾過し、粒子をフィルター上に残した際に、粒子が孔上に位置せず、ランダムに、あるいは粒子同士が重なり合ってフィルター上に配列される確率が高くなる。粒子が細孔に入り込み脱離できなくなることをさらに防止し、且つ細孔上に細密充填配列する確率をより高くするためには、上記の関係が、 $\text{粒子径}/\text{孔径}=1.15\sim2.0$ であることがより好ましく、さらに好ましくは $\text{粒子径}/\text{孔径}=1.2\sim1.6$ である。また、孔間隔が粒子径以下である場合、粒子を含む溶液をフィルターを介して濾過し、粒子をフィルター上に残した際に、粒子が細孔上に位置せず、ランダムに、あるいは粒子同士が重なり合ってフィルター上に配列される確率が高くなる。また孔間隔が粒子径の10倍以上である場合、粒子を含む溶液をフィルターを介して濾過する際に、細孔上に配列される粒子以外に、細孔間に配列される粒子が増えるため、ランダムに、あるいは粒子同士が重なり合ってフィルター上に配列される確率が高くなる。

#### 【0132】

1ウエルに収納する全粒子数は用途により異なり、分離分画用途の場合はフィルター細孔数の10倍～1/100倍、好ましくはフィルター細孔数の3倍～1/10倍の範囲内であり、検出・同定の場合は各プローブごとに粒子の絶対数で1～1000個、より好ましくは1～500個、さらに好ましくは1～200個である。1ウエル内の粒子数が多いと、濾過に際してフィルターの目詰まりの原因となり濾過性能を低下させる。またフィルターの細孔数との比率が近接し、フィルターの孔に複数の粒子が積層され凝集の原因となる。検出・同定に際して有意となる粒子数は1000個でも充分であり、それ以上は意味がなくむしろ濾過性を困難にする。

#### 【0133】

各ウエルへ収納するプローブ担持粒子の絶対数は、次の方法で制御することができる。すなわち、粒子溶液の投入時にフローサイトメーターで粒子を個別に制御しながらCCDカメラなどで個々の粒子を実際にカウントしながら投入することにより制御することができる。あるいは、あらかじめ粒子溶液の粒子濃度を測定しておき、当該溶液内の粒子濃度



と粒子の比重から粒子数を計算して、この結果から逆算した粒子溶液量をスポッター等で投入することで、近似の粒子数をセル部屋に投入することができる。また、複数回に分けて所定数の粒子をスポットし、スポットした粒子数をその都度カウントして不足量を算出し、不足量がゼロ近似になるまでスポットを行う方法も可能である。

#### 【0134】

ここで、粒子数は、ある程度の近似的な同一性があればよいが、その誤差範囲はCV値で20%以内であることが好ましく、より好ましくは10%以内である。

#### 【0135】

プローブを担持する粒子としては、フィルターの細孔径よりも大きな径をもつ粒子であれば特に限定されず、有機粒子、無機粒子、有機無機粒子、相転移ゲルなどのいずれも使用可能である。

#### 【0136】

有機粒子としては、具体的には、ブタジエン系、スチレン系、ジビニルベンゼン系、アクリロニトリル系、アクリレート系、メタクリレート系、アクリルアミド系、ベンゾグアナミン系、ナイロン系およびフッ素系等のモノマーを、単独であるいは2種以上を組み合わせ用いたモノマー原料から、乳化重合あるいはサスペンション重合により得られた粒子を使用することができる。あるいは多孔質の均一孔を持つプレートから樹脂を押し出して粒子を作成する膜乳化などによる方法も可能である。これらの粒子は必要に応じて分級機にて粒子径を揃えることも可能である。

#### 【0137】

また、重合時にあるいは重合後にフェライト等の磁性体を添加して得られたもの、あるいは特開平10-83902などの方法にて粒子をフェライトメッキしたもの、あるいはセルロース、デンプン、アガロース、ガラクトース等の天然物架橋ゲル、アクリルアミド等の合成架橋ゲルも使用することができる。

#### 【0138】

これらの粒子径の粒子径分布は、CV値で10%以内とすることが好ましく、より好ましくは5%以内である。CV値が10%を超える場合、粒子がフィルターの孔に入り込む確率が高くなる。

#### 【0139】

スチレン系の粒子については、例えば特開昭57-168163号公報に記載の方法により得ることが可能である。

#### 【0140】

また、磁性粒子は、例えば特開平11-176622号公報に記載の方法により得ることが可能である。

#### 【0141】

無機系の粒子としては、金属酸化物粒子、金属硫化物粒子、金属粒子を使用することができる。

#### 【0142】

金属酸化物粒子として最も好ましいのは、シリカ粒子であり、市販の各種シリカ粒子を使用することができる。

#### 【0143】

また、市販されている各粒子が使用可能であり、例えば、イムテックス（商品名：JSR）、MC Iゲル（商品名：三菱化学）、トヨパール（商品名：東ソー）、ダイソーゲル（商品名：ダイソー）、サンスフェアー（商品名：旭硝子）、PL-PEGA（商品名：Polymer Laboratories）、PL-CMS（商品名：Polymer Laboratories）、PL-PBS（商品名：Polymer Laboratories）、PL-DMA（商品名：Polymer Laboratories）、AM resin（商品名：Novabiochem）、P500（商品名：東レ）、トレパール（商品名：東レ）、テクポリマー（商品名：積水化成工業）、MP、MRシリーズ（商品名：綜研化学）、ベルパール（商品名：鐘紡）、エポスター（商品名：日本触媒工業）、セルロースパウダー（チッソ、旭化成）、セファセル（商品名：アマーシャムフォルマシア社）、セフ

アロース（商品名：アマーシャムフォルマシア社）などが使用可能である。

【0144】

前記粒子表面を、アミノ基、カルボキシ基、カルボジイミド基、エポキシ基、トシル基、N-サクシイミド基、マレイミド基、チオール基、スルフィド基、ヒドロキシ基、トリメトキシシリル基、ニトリル三酢酸基、ベンゾスルホアミド基、ポリエチレンイミン基等の各種官能基、あるいはγ-グリシドオキシプロピルトリメトキシシランなどにより表面修飾して、プローブ結合サイトとすることができる。

【0145】

また、これらの表面修飾に際して、粒子担持プローブと被検体との反応の際の立体障害を低下させるために、炭素数10～100のアルキレン基の両端に官能基が結合した構造の化合物、例えば、エチレングリコールジグリシジルエーテル誘導体、N-k-マレイミドウンデカニック酸、メルカプトプロピルトリメトキシシラン、カリックスアレン誘導体、液晶をスペーサーとして使用することができる。また、アミノ基、カルボキシ基、チオール基などで修飾されたオリゴヌクレオチドもスペーサーあるいはスペーサー兼結合サイトとして使用可能である。

【0146】

プローブを担持する粒子として、有機粒子を使用する場合、その粒子径は、 $0.02\mu\text{m}$ ～ $120\mu\text{m}$ が好ましく、より好ましくは $0.1\mu\text{m}$ ～ $60\mu\text{m}$ である。粒子径が小さい場合にはハンドリング性に難点が生じ、これらの粒子を捕捉するフィルターの作成が困難となり、またフィルター孔が小さいために被検体が目詰まりしやすくなる。また粒子径が大きい場合には、立体障害のために反応性が低下することがある。

【0147】

また、必要に応じて粒子を多孔質または中空状にすることが好ましい。これによって、粒子径が大きい場合であっても、重量による粒子の沈降に起因する被検体との反応性の低下を防ぐことができる。

【0148】

プローブを担持する粒子として、無機粒子を使用する場合、その粒子径は、 $0.1\mu\text{m}$ ～ $0.1\text{mm}$ が好ましく、より好ましくは $1\mu\text{m}$ ～ $0.05\text{mm}$ である。粒子径が小さい場合にはハンドリング性に難点が生じ、特にフィルターの細孔による粒子の捕捉が困難となる。また粒子径が大きい場合には、沈降するために反応性が低下することがある。

【0149】

また、必要に応じて粒子を多孔質にすることが好ましい。これによって、粒子径が大きい場合であっても、重量による粒子の沈降などを防止することができる。

【0150】

プローブ担持粒子を各ウエルへ収納する方法としては、粒子にあらかじめ各ウエルに対応した各種のプローブを別途固定化しておき、これをスポッター等で対応するセル内に投入する方法が挙げられる。あるいは、プローブ結合サイトを表面に有する粒子をスポッター等で各ウエルに投入し、次いで、所定のウエルに対応した、種類の異なるプローブをスポッターなどで対応するウエルに投入する方法を用いることも可能である。

【0151】

前者の方法では、粒子にプローブを結合する方法として、市販されている各社の固相合成機を使用することができ、例えば、オリゴヌクレオチドの合成機、ペプチドの合成機、糖鎖合成機、コンビナトリアルケミストリーによる各種低分子化合物合成機などを使用することができる。固相法では反応と分離のために担体としてシリカビーズやポリスチレンジビニルベンゼン粒子が使用されており、これらの固相合成担体ビーズとチップ10に収納する粒子担体を兼用することで、合成機で合成したプローブ担持ビーズをそのままチップ10にスポットして収納することが可能である。これらの合成機、特にオリゴヌクレオチドの合成機は汎用に普及使用されており、現在では、例えば夕方に合成機をセットすれば、翌朝にはオリゴヌクレオチドを固定化した粒子を作成することもできるようになり、これをスポットするだけで任意のヌクレオチドをもつオーダーメイドチップを極めて短

時間に作成することができる。

【0152】

粒子に担持するプローブとしては、例えば、核酸、分子量500～100万のタンパク質、脂質、糖鎖、細胞、タンパク質発現細胞、アプタマー、ウイルス、酵素、分子量50～100万の、薬理活性を有するリード化合物、あるいは特定の生理活性作用を持つか、これを持つ可能性のある化学物質などを使用することができる。

【0153】

このうち、分子量50～100万のタンパク質としては、具体的には、合成ペプチド、膜タンパク質、酵素、輸送蛋白、サイトカイン、リンフォカイン、IgAおよびIgEなどの抗体、各種抗原、あるいはルシフェリン、ルシフェラーゼ、エクオリン、クリーン蛍光タンパク質等の生物発光機能を有するものなどが挙げられる。

【0154】

脂質としては、具体的には、ホスファチジン酸、ホスファチジルイノシトーマンノシド、ウルシオール、各種のガングリオシドなどが挙げられる。

【0155】

アプタマーは、タンパク質、酵素、色素、アミノ酸、ヌクレオチド、成長因子、遺伝子発現調節因子、細胞接着分子、生物個体などと結合能力のある機能性核酸であり、具体的には、トランピンアプタマー、エラスターゼアプタマー、活性化ブティンC、C型肝炎ウイルスのNS3プロテアーゼアプタマーなどが挙げられる。

【0156】

分子量50～100万の、低分子リード化合物としては、具体的には、基質、補酵素、調節因子、レクチン、ホルモン、神経伝達物質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー等のリガンド、フェニルピペリジン誘導体、スルホンアミド／スルホン酸誘導体、ステロイド、プロスタグランدين誘導体などの医薬候補物質が挙げられる。

【0157】

プローブ担持粒子は、プローブの種類を識別するためのプローブ識別情報を与えるための少なくとも一種の識別手段を有することが望ましい。このような識別手段としては、プローブ担持粒子の色、形状および粒子径が挙げられる。

【0158】

これらの識別手段は複数を組み合わせてもよく、例えば色と粒子径、色と形状などの組み合わせが可能である。識別手段を色とするためには、粒子を染料、顔料、蛍光染料などで含浸着色させる。これらの染料、顔料、蛍光体、燐光体について、異なる吸収、発光波長を持つものとその色濃度とを組み合わせることで、さらに多数のプローブ識別情報を得ることが可能である。例えば、色の種類として2色、色濃度として3濃度を用いることで9種類の識別情報を得ることが可能である。染色粒子としては、例えば、JSRのIMMUTEXなどが使用可能である。また、蛍光粒子は、Molecular Probes, Inc.のFluoSpheres fluorescent microspheresとして販売されているカルボキシル変性、スルホン酸変性、アルデヒドスルホン酸変性、アミン変性粒子などが使用可能である。

【0159】

これらの色識別情報は次のようにして検出される。まず、色標識された粒子に光源を照射する。色素標識が蛍光体、燐光体である場合は、対応する蛍光あるいは燐光励起波長光源である必要がある。次いでCCDカメラ、光電子増幅管などで粒子からの蛍光あるいは燐光などを光学的に検出し、得られた検出情報を統計的に処理してプローブ識別情報を得る。

【0160】

また、粒子径を識別情報とする場合には、あらかじめ粒子径の大きさを各プローブに対応して変えたものを用意する。これらの粒子径としては、検出感度の問題から、粒子径の差を0.3  $\mu$ m単位以上とすることが好ましく、より好ましくは0.5  $\mu$ m以上である。

【0161】

このように、ウエル内に複数の識別可能なプローブ担持粒子を収納することで、1 ウエルで同時多項目検出が可能となり、反応時間と操作工程が短縮する。また、複数のウエルを有するチップを用いてウエルの位置情報と複数の識別可能なプローブ担持粒子を組み合わせることで、例えばウエル数を100ウエル、識別可能なプローブ担持粒子の種類を100とすることで $100 \times 100 = 10,000$ 種類のプローブを収納するバイオチップを得ることが可能となる。

#### 【0162】

上述したような識別手段を有するプローブ担持粒子は、以下のように各ウエルへ収納される。

(i) 全ての識別手段における識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ粒子について、識別情報が同一である。すなわち、一つのウエルに色、粒子径などのプローブ識別手段が同じであり、色の種類、粒子径のサイズなどの識別情報も同一である複数の粒子が収納され、各ウエル間についても同じ粒子が収納されている。なお、識別情報が同一であることが予め判明している場合は、プローブ識別情報とプローブ識別工程は無視することも可能である。

(ii) 全ての識別手段における識別情報が同一である複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ粒子について、識別情報が異なっている。すなわち、一つのウエルに色、粒子径などのプローブ識別手段が同じであり、色の種類、粒子径のサイズなどの識別情報も同一である複数の粒子が収納され、各ウエル間については、識別手段は同一であるが色の種類、粒子径のサイズなどの識別情報が異なる粒子が収納されている。

(iii) 少なくとも一種の識別手段における識別情報が異なっている複数のプローブ粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ粒子について、その全ての識別手段における前記識別情報の構成が同一である。すなわち、一つのウエルに、色、粒子径などのプローブ識別手段の少なくとも一つについて、色の種類、粒子径のサイズなどの識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が収納され、各ウエル間については、この識別情報の構成は同一である。

(iv) 少なくとも一種の識別手段における識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が同一ウエルに収納されるとともに、各ウエルに収納された複数のプローブ粒子について、その少なくとも一種の前記識別手段における前記識別情報の構成が異なっている。すなわち、一つのウエルに、色、粒子径などのプローブ識別手段の少なくとも一つについて、色の種類、粒子径のサイズなどの識別情報が異なっている複数のプローブ担持粒子が収納され、各ウエル間について、この識別情報の構成が異なっている。

#### 【0163】

アッセイの内容に応じて、ウエルの数およびウエルに収納されるプローブ担持粒子の構成が適宜選択される。例えば、図20(a)に示したように単一のウエルに同一のプローブ担持粒子を収納する態様；図20(b)に示したように単一のウエルに識別情報が異なるプローブ担持粒子を収納する態様；図20(c)に示したように複数のウエルに同一のプローブ担持粒子を収納する態様；図20(d)に示したように複数のウエルに識別情報が異なるプローブ担持粒子を収納するとともに、各ウエル間での識別情報の構成が同一である態様；図20(e)に示したように複数のウエルに識別情報が異なるプローブ担持粒子を収納するとともに、各ウエル間での識別情報の構成が異なる態様などを挙げることができる。

#### 【0164】

本発明のバイオチップは、これが備える一体化した複数のウエルもしくは単一のウエルを収納して、ウエル底部のフィルターを介して被検体溶液などの共通室を構成する容器をさらに備えていてもよい。この容器は、上記の一体化した複数のウエルもしくは単一のウエルとともに一体に形成されていてもよい。あるいは、この収納容器をこれらのウエルと独立に形成して、ウエルを当該容器へ収納し、当該容器から取り出すことができるように

してもよい。

【0165】

例えば、上述したプローブ担持粒子を収納したウエルに被検体を投入する際には、図 21 (a) のようにウエル 16 の上部開口から投入する他、図 21 (b) のように容器 12 に收容した一被検体と各ウエル 16 の底部を接触するようにしてもよく、あるいは、図 21 (c) のように各ウエル 16 に対応する区画を有する容器 12 に区画ごとに異なる被検体を收容し、これに各ウエル 16 の底部を接触させることにより、各ウエル 16 ごとに異なる被検体を收容することも可能である。

【0166】

図 11 および図 12 は、本発明のバイオチップの一実施形態を示した上面図および A-A' 断面図である。図 11 および図 12 に示したように、バイオチップ 10 は、容器 12 と、複数のウエル 16 からなるチップ 14 とを有している。

【0167】

チップ 14 は、側壁 20 で仕切られた複数のウエル 16、16・・・からなり、これらのウエル 16、16・・・には、例えば、担持するプローブの種類が各ウエル 16 ごとに異なるプローブ担持粒子が収納される。

【0168】

ウエル 16 の底壁 22 は、フィルター 18 で形成されている。このフィルター 18 は、ウエル 16 に収納されたプローブ担持粒子を遮断するとともに、このバイオチップ 10 を用いて分離、検出等を行う被検体、各種の緩衝液、洗浄液、分離剤、ラベル剤、二次抗体、増感剤などを有する各種溶液を通過させる。

【0169】

容器 12 の内部に導入されたこれらの各種溶液は、フィルター 18 を介して全てのセルへ入出できるようになっている。すなわち、これらの各種溶液は、フィルター 18 を介してウエル 16 と隣接する、チップ 14 と容器 12 との間隙で構成されるこれらの各種溶液の収納室 26 を介して、フィルター 18 から任意のウエル 16 へ入出できるようになっている。

【0170】

あるいは、側壁 20 も同様にフィルター 18 で形成されていてもよく、この側壁に形成されたフィルター 18 を介して、隣接するウエル 16、16 間でこれらの各種溶液を行き来させることも可能である。この場合、底壁 22 を形成するフィルターと、側壁 20 を形成するフィルターとは互いに同質のもので連続して形成されていてもよく、それぞれ異質のフィルターで構成して構成した複合フィルターとしてもよい。

【0171】

容器 12 とチップ 14 は、図 11 (a)、(b) に示したように、両者を同一材料から一体に形成するか、あるいは両者を接着して固定することにより、容器 12 の内部において、ウエル 14 と容器 12 とを一体化してもよい。

【0172】

あるいは、図 12 (a)、(b) に示したように、バイオチップ 10 を、それぞれ独立した容器 12 とチップ 14 の二体から構成して、チップ 14 が、容器 12 の内部に収納されるようにしてもよい。この場合、容器 12 は各操作時において常に同一である必要は無く、その単位操作に応じて当該容器および溶液收容容器を変更することも可能である。

【0173】

上記のように構成されたバイオチップ 10 では、各ウエル 16 に収納されたプローブ担持粒子は、そのウエル位置によりプローブの内容が特定され、複数のプローブをチップ上にコンタミすることなく収納することができる。

【0174】

これらのバイオチップ中に收容されたプローブ担持粒子溶液と被検体、各種の緩衝液、洗浄液、分離剤、ラベル剤、二次抗体、増感剤などを有する溶液は、プローブ担持粒子が収納されたウエル 16、16・・・間を自由に行き来することができ、チップ 10 の構造

、あるいは前記溶液の攪拌条件を適宜選択することにより、全てのウエル16、16・・・へ前記溶液を循環させることができ、前記溶液と、複数の種類の粒子担持プローブとの接触あるいは反応の機会が与えられる。

【0175】

チップ14と容器12との間隙で構成される溶液の収納室26へ、全てのウエル16、16・・・が、底壁22または側壁20を形成するフィルター18を介して直接に隣接していることが好ましい。

【0176】

この溶液収納室26は、例えば図11(a)、(b)のようにチップ14の底下面と容器12の底部上面との間隙で構成される他、図12(a)、(b)のように、それぞれ独立したチップ14と容器12との間隙で構成される。

【0177】

このように構成することによって、前記溶液は、これを共通に収納する溶液収納室26から、攪拌と必要に応じて加減圧を行うことにより、1層のフィルター18を通過して、それぞれ異種のプローブを担持した粒子を収納する複数のウエル16、16・・・に並列的に到達して、並列的に接触、反応が行われる。

【0178】

さらに、特定のウエル16内で反応しなかった未反応の被検体は、さらに攪拌あるいは加減圧により他のウエル16内に到達して接触、反応が試みられる。このように各ウエル16、16・・・間で逐次的に未反応の前記溶液とプローブ担持粒子との接触、反応が試みられる。

【0179】

そして、溶液収納室26と各ウエル16、16・・・とが1層のみのフィルター18を介して隣接しているため、圧力損失は最低限で済み、また、溶液収納室26への到達と、各ウエル16におけるプローブ担持粒子との反応が並列で行われるために接触、反応時間を最短にすることが可能となる。

【0180】

さらに、フィルター18の細孔径と、その深さを適当な条件に設定することで、圧力損失を極めて低減することが可能であり、前記溶液は、あたかもフィルター18が無い一つのスペースを移動するかのよう、プローブ担持粒子を収納した全てのウエル16、16・・・と、前記溶液の共通部屋を構成する溶液収納室26との間を自由に移動することが可能となる。

【0181】

あるいは、第一のフィルターが底部に設けられるとともに、ウエルを挟んで第一のフィルターとは反対側に第二のフィルターが設けられている構造とすることも可能である。この例を図13(a)に示す。同図に示したように、このバイオチップの上部には第二のフィルターとして上側フィルター18'が設けられている。この上側フィルター18'は、プローブ担持粒子をウエル16内へ収納した後に取り付けられる。その取り付け方法としては、前述したように接着剤、磁力、機械的な嵌合、機械的な加圧などが挙げられる。また図13(b)に示したように、予め上容器81と下容器82のそれぞれにフィルター18'と底面フィルター18を有するウエル16のいずれかを取り付け、上容器81と下容器82を接合した後に、粘着剤、磁石、クランプなどの機械的な加圧力により取り付ける方法も可能である。本方法では、機械的な加圧力のセット/リセットにより上側フィルター18'と底面側フィルター18とを任意に切り離すことが可能である。あるいは、図(c)に示したように、上容器81に底面フィルター18を有するウエル16を下容器82とは上下逆さに取り付け、上容器81と下容器82とをウエル16同士が接合するように前記方法のいずれかで取り付けることも可能である。

【0182】

上述したようなフィルター18が各ウエルの底部に形成されたチップ14は、例えば次の方法で作製することができる。



(1) 図14(a)に示したように、フィルター18をコルゲート状にして、その凸頂部32と凹頂部34とを、側壁20を構成する適当なフィルムあるいはフィルターで接着して各ウエル16、16・・・を形成する方法

(2) 図14(b)に示したように、金属、あるいは樹脂製のフィルターを、プレス金型を用いて、所定の間隔に凹部を有する形状に成型してこの凹部をウエル16、16・・・とする方法、あるいはさらにその片側を別のフィルターあるいはフィルムを粘着剤、磁石や機械的な嵌合などの方法で接合して閉ざされた空間を有するウエルを形成する方法。

(3) 図14(c)に示したように、ウエル16、16・・・の底壁22に、レーザー、プレス、フォトエッチング等で貫通孔を穿設してフィルター18とする方法、あるいはさらにウエルの上をフィルターで粘着剤、磁石や機械的な嵌合により接合する方法

(4) 図14(d)に示したように、底壁22の無い、側壁20で形成されたものを作成し、その底部にフィルター18を接着する方法、あるいはさらにウエルの上をフィルターで粘着剤、磁石や機械的な嵌合により接合して覆う方法

(5) 金属、金属酸化物、あるいは樹脂等をレーザーによる穿孔、機械プレスまたはフォトエッチングする方法

容器12の材質は特に限定されず、有機材料および無機材料のいずれも使用することができる。有機材料としては、具体的には、ポリエチレン、ポリエチレン酢酸ビニル樹脂、ポリエチレンビニル樹脂、ポリプロピレン、ポリスチレン、ポリブタジエン、ポリアクリロニトリル樹脂、ポリメチルメタアクリレート樹脂、AS樹脂（アクリロニトリルとスチレンの共重合体）、ABS樹脂（アクリロニトリル、ブタジエンおよびスチレンの共重合体）、AAS樹脂（アクリロニトリル、アクリル酸エステルおよびスチレンの共重合体）、ポリカーボネート、ポリアミド樹脂、ポリエチレンテレフタレート、ポリエチレンナフタレート、脂肪族ポリエステル、ポリ乳酸、ポリグリコール酸、脂肪族ポリアミド、脂環式ポリアミド、シクロオレフィン、ポリメチルペンテン、ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリアリレート、ポリサルホン、ポリエーテルサルホン、ポリイミド、トリアセチルセルロース、セルロースアセテート樹脂、硝酸セルロース樹脂、エポキシ樹脂、ポリテトラフルオロエチレン、フッ化エチレンポリプロピレンコポリマー、テトラフルオロエチレンパーフロオロアルコキシビニルエーテルコポリマー、ポリクロロトリフルオロエチレン、エチレンテトラフルオロエチレンコポリマー、ポリフッ化ビニリデン、ポリフッ化ビニル、シリコン樹脂などが挙げられる。

#### 【0183】

これらの有機材料の成形方法としては、例えば、射出成形、プレス成形、射出圧縮成形、射出プレス成形、圧縮成形、トランスファー成形、切削成型等が可能であるがこれらに限定されるものではない。

#### 【0184】

無機材料としては、具体的には、ニッケル、銅、鉄、アルミニウム、チタン、シリコン等の金属；シリカ、アルミナ、チタニア等の金属酸化物、ソーダーガラス、ホウ珪酸ガラス、パイレックス（商標）、石英ガラス等のガラスなどが挙げられる。

#### 【0185】

これらの無機材料は、プレス成型、板のエッチング、樹脂もしくは金属容器への表面塗布などに例示される、成型あるいは表面処理加工などの各種方法により容器形状とすることができる。

#### <バイオチップの操作方法>

本発明のバイオチップの操作方法では、バイオチップのウエルに收容されているプローブ担持粒子が分散された溶液と、容器内に收容されている、例えば被検体、各種の緩衝液、洗浄液、分離剤、ラベル剤、二次抗体、増感剤などを有する各種溶液とを接触可能な状態にしてウエル内の溶液と容器内の溶液を循環させることによって、両溶液を高効率に混合、拡散、反応、洗浄または分離することができる。

#### 【0186】

これらの両者の溶液を接触可能な状態にする方法としては、バイオチップを容器内の溶

液中を上下に移動させて容器内の溶液と接触させる方法（図15（a-1）→（a-3）、図15（c-1）→（c-3））、容器内の溶液を、ノズル86を介した加圧／減圧や、溶液の外部からの注入排出などによる方法で溶液界面を上下させることにより、ウエル内へ移動させて当該ウエル内の溶液と接触させる方法（図15（b-1）→（b-2）、図15（d-1）→（d-2））が可能である。

#### 【0187】

このように容器内の溶液を、加圧／減圧や、溶液の外部からの注入排出などの方法で増減して容器内溶液の界面を上下させることで、プローブ付き粒子をバイオチップ内に残留させた状態で、ウエル内の溶液が容器内の溶液と一体化され、ウエル内の溶液をウエル内外に移動させることが可能となる。この方法を繰り返すことにより、容器内の溶液とウエル内の溶液とを高効率に混合、拡散、反応、洗浄または分離することができる。

#### 【0188】

あるいは図15（e-1）～（e-5）に示したように、フィルター18'を取り付けた上容器81と、底部にフィルター18を有するウエル16を取り付けた下容器82とを接合し、上容器81と下容器82に加減圧および溶液投入排出を行うノズル83、84を設けたものを用意し（図15（e-1））、ノズル83を介して加減圧を行うことにより、この加圧力あるいは減圧力により上容器81内の溶液をウエル16内の溶液と接触させ、上容器81の溶液をウエル16内の溶液と混合させ図15（e-2）、さらに下容器82に移動させる（図15（e-3））。さらにノズル84を介して加減圧により溶液を容器外に排出する（図15（e-4））。また、ウエル内を別の溶液85で充填する（図15（e-5））ことも可能である。

#### 【0189】

この場合、上容器81と下容器82の容積を同量とし、投入溶液量を上下の各容器容積より僅かに多くすることが好ましく、これにより下容器82に溶液を移動した場合に上容器81にも溶液を残すことができ、フィルター内に空気を噛ませることが無く加減圧力を最小とすることができる。

#### 【0190】

また上述したウエルの上下、溶液の移動に際して、移動は連続的に行なわず、途中に所定の時間停止するように、間欠的に移動させることが好ましく、あるいは、正方向の移動の途中、短時間負方向の移動を入れることが好ましい。この方法によりウエル内の粒子はフィルターに張り付かず、移動の停止あるいは負方向の移動によりウエル内を循環して、バイオチップ内の溶液と粒子との接触効率を最大限にすることができる。

#### <被検体の投入方法>

バイオチップの各ウエルには、同一または異なる被検体を投入することができる。各ウエルに同一の被検体を投入する場合、各ウエル上から各ウエルに同一の被検体をスポッターなどでスポット投入するか、あるいは容器内溶液を被検体として、前述した方法によりウエル内溶液と接触させ、ウエル内溶液と循環、混合、拡散、反応させることができる。

#### 【0191】

チップのウエル数が多い場合は、容器内の被検体を介する方法が好ましい。スポットによる逐次スポットではスポット時間が掛かり、並列スポットは多数のスポッターが必要となる。

#### 【0192】

また、各ウエルにそれぞれ異なる被検体を投入する場合、各ウエルから異なる被検体をスポッターなどでスポット投入するか、あるいはウエルごとに独立した容器に収容されたそれぞれ異なる被検体を、前述した方法によりウエル内溶液と接触させ、ウエル内溶液と循環、混合、拡散、反応させることができる。

#### 【0193】

ここに用いられる被検体としては、各種の培養液、組織、菌、ウイルス、細胞、リンパ球、脂質、糖鎖、核酸、尿、血液、血清、血球、ヒト／マウスサイトカイン、セリン／スレオニン、キナーゼ、分子量50～100万のタンパク質である合成ペプチド、膜タンパ



ク質、酵素、シグナル伝達蛋白、輸送蛋白、リン酸化タンパク質等の各種タンパク質、サイトカイン、リンフォカイン、IgAおよびIgE等の抗体、各種抗原、転写因子、分子量50～100万の低分子リード化合物、基質、補酵素、調節因子、レクチン、ホルモン、神経伝達物質、アンチセンスオリゴヌクレオチド、リボザイム、アプタマー等のリガンド、各種の医薬候補物質、生理活性を有するか、あるいは生理活性を有する可能性がある各種の化学物質などを挙げることができるがこれらに限定されるものではない。

#### 【0194】

また、競合的ハイブリダイゼーションあるいは競合的イムノアッセイ反応を使用する場合には、標的物質を含む被検体と共に標準物質を含む標識被検体を同時に併用して用いる。

#### 【0195】

また、被検体以外に、各ウエルに対応して異なる材料、例えば各種の緩衝液、洗浄液、ラベル剤、二次抗体、増感剤なども上述した方法により投入可能である。

#### <被検体中の標的物質とプローブとの反応方法>

本発明のバイオチップを用いた被検体中の標的物質とプローブとの反応方法では、以下の(1)～(3)の工程により反応を行う。

(1) ウエルを収納する容器を備えるバイオチップのウエルに、前述したいずれかの方法により特定の粒子をウエルに収納する工程。なお、この工程は、予めチップ作成時にチップ製造者にて調整されていても構わない。

(2) バイオチップのウエル内に、被検体を含む溶液を投入して、上述した操作方法に基づき、当該被検体と、全てのウエル内の前記粒子とが接触可能な状態とする工程。この工程では、例えばウエルを容器内溶液中で上下させるか、あるいは容器内溶液の界面を移動させることにより、容器内溶液とウエル内溶液とを一体化させ、被検体中の標的物質とプローブとの拡散（および反応）を行う。

(3) バイオチップの容器に收容された前記溶液中でウエルを上下させるか、あるいはバイオチップの容器に收容された前記溶液の界面を上下させることにより被検体中の標的物質とプローブとの反応を行う工程。この工程では、上述した操作方法に基づき、被検体とプローブとの反応を進行させる。

#### <B/F分離方法>

本発明のバイオチップを用いたB/F分離方法は、上記の反応方法における(1)～(3)の工程と、以下の(4)、(5)の工程により行なう。

(4) 前記溶液の界面の高さを、ウエル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウエル内から除去する工程。

(5) 洗浄液をバイオチップのウエルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウエルに循環させて該バイオチップのウエル内外へ洗浄液を出し入れさせ、洗浄液をウエル外へ排出することにより、プローブ結合標的物質以外の物質を洗浄除去する工程。

#### <分画分離方法>

本発明のバイオチップを用いた被検体中の標的物質の分画分離方法は、上記の反応方法における(1)～(3)の工程と、以下の(4)～(6)の工程により行なう。

(4) 前記溶液の界面の高さを、ウエル底部のフィルターの下面未満となるまで低下させて、前記粒子に担持したプローブと反応していない被検体を各ウエル内から除去する工程。

(5) 洗浄液をバイオチップのウエルに投入し、前記容器を介して洗浄液を該バイオチップのウエルに循環させて、該バイオチップのウエル内外へ洗浄液を出し入れすることにより、プローブ結合標的物質以外の非標的物質を除去する工程。

(6) 前記バイオチップのウエルの下端に設けられた凹部または凸部と嵌合する凸部または凹部を有する容器と該バイオチップとを嵌合させ、次いで分離剤溶液を投入して、これにより前記粒子から被検体中の標的物質を分離し、前記容器内における前記ウエルに対

応する区画へ移動させる工程。

【0196】

以下、本発明の被検体の分画分離方法の一例について、図16～18に基づき具体的に説明する。最初に、バイオチップの各ウエル16ごとに、それぞれ異種のプローブを担持した粒子を収納する。

【0197】

次いで、図16(a)、(b)に示したように、バイオチップ10の容器12内に、被検物質25を含む被検体溶液を投入して、被検体と、全てのウエル16内のプローブ担持粒子24とが接触可能な状態とする。この際、ウエル16内における溶液界面の高さは、側壁20の高さを超えないことが必要である。

【0198】

このように所定の界面高さとなるまで被検体を含む溶液を投入する方法としては、例えば以下の方法が挙げられる。第一の方法は、図12に示したバイオチップ10のように、チップ14と容器12が独立したものをを用いて、予め容器12に被検体溶液を入れておき、そこにチップ14を下に移動させて浸漬して、フィルター18を介して各ウエル16内に被検体溶液を進入させる方法である。この際に、フィルター18の圧力損失がある場合は、チップ14と容器12とが相互に接する部分をシールしてフィルター18に加圧力あるいは減圧力が掛かるようにすることで、被検体溶液をフィルター18を通過させて各ウエル16内に導くことができる。

【0199】

第二の方法は、図11に示したバイオチップ10のように、あらかじめ容器12の底面と、フィルター18との距離を一定としたチップを用いて、容器12の低壁もしくは側壁に形成した導入口から溶液収納室26を介して被検体溶液を投入する方法である。

【0200】

被検体溶液はウエル開口部17から投入してもよく、この場合には、スポッター等で各ウエル16ごとに均等量を投入することが好ましい。また、被検体溶液を、例えば図14における42のような導入口を通して投入する場合は、当該導入口から加圧して被検体溶液を送り込むか、あるいは溶液収納室26側を減圧にして被検体溶液を送り込む方法のいずれの方法も可能である。

【0201】

これらの方法により、被検体と、全てのウエル16内のプローブ担持粒子24とを接触させることができる(図16(a))。ウエル16内のプローブ担持粒子と被検体溶液を混合、拡散、反応させる方法としては、例えば図11(b)および図12(b)のように側壁20がフィルター18で形成されて隣接する各ウエルがフィルター18で仕切られている場合は、被検体溶液を攪拌することで、各ウエル16内の溶液を入れ替えることができる。この攪拌方法としては、攪拌羽根の付いた攪拌機、音波あるいは超音波による振動、空気や常磁性体の移動による攪拌など、既存の方法による攪拌が可能である。これらのうちで特に好ましいのは音波あるいは超音波による振動であり、容器12またはチップ14を振動させるか、あるいは振動子をチップ10内の被検体溶液中に入れる方法などいずれも可能である。この場合、振動の適用周波数は、プローブや被検体の種類により適宜調節することができ、100Hz～1GHzが使用可能であり、好ましくは1kHz～300MHzである。この範囲の周波数では、インピーダンスが低く、対象物の損傷を最低限に抑えることができる。適用周波数が100Hz未満では、攪拌能力が低く、適用周波数が1GHzを超えると、被検体あるいはプローブを損傷する可能性がある。また、図12のように容器12とチップ14が独立している場合には、チップ14を容器12内の溶液の界面から引き上げた後に容器12内の当該溶液を上述した方法のいずれかで攪拌し、次いでチップ14を容器12内の溶液に再度浸漬させる方法、あるいはチップ14を水平面で回転するか、あるいは上下移動することにより容器12とチップ14とを相対移動させる方法によって各ウエル16内の溶液を入れ替えることができる。ウエル16同士がフィルター18ではない側壁で仕切られている場合は、底壁22のフィルター18から溶液を

溶液収納室 26 に導き、次にフィルター 18 を通して他のウエル 16 内に溶液を導くことにより溶液の入れ替えをすることができる。

#### 【0202】

あるいは、図 11、12 の何れのチップの場合も、導入孔 42 から加圧空気を導入して容器 12 内における被検体溶液の界面を押し上げることによりウエル 16 内に被検体溶液を導入することが可能である。

#### 【0203】

次いで、図 17 (a) に示したように、被検体溶液の界面の高さを、ウエル 16 の底壁 22 の下面未満となるまで低下させて、プローブ担持粒子 24 に担持したプローブと反応していない非標的物質を除去する。ここで、溶液界面の高さをフィルター 18 の底面以下にする方法としては、被検体溶液を、底壁 22 のフィルター 18 を介してポンプあるいは加減圧等により排出口 44 から容器 12 外へ、あるいは溶液収納室 26 へ移す方法が挙げられる。また、容器 12 とチップ 14 とが独立している場合には、容器 12 とチップ 14 とを相対移動させてフィルター 18 を上下させる方法、あるいはチップ 14 を、バイオチップ 10 と隣接する容器、あるいは独立した別の容器に移す方法が挙げられる。

#### 【0204】

さらに、本操作の前後において、必要に応じて、各種の洗浄剤や各種の緩衝液などの薬液を投入しても良い。これらの投入方法は被検体の投入方法と同様に行うことができる。

#### 【0205】

次いで、図 18 に示したように、各ウエル 16 へ、上部の開口 17 から分離剤溶液を投入して、被検体の標的物質と反応したプローブ担持粒子からこの標的物質を分離して、各ウエル 16 に対応する複数の標的物質収納ウエル 52 を備えた容器 54 へ標的物質を移動させる。

#### 【0206】

分離剤溶液は、スポッター等を用いてウエル開口 17 から、各ウエル 16 ごとに個別にあるいは各ウエル 16 へ一度に投入することができる。

#### 【0207】

標的物質を分離した溶液を移動させる容器 54 は、各ウエル 16 とそれぞれ対応した複数の標的物質収納ウエル 52、52・・・を設けた容器 54 であれば特に限定されない。例えば、ウエル 16、16・・・と略同一のサイズを有する標的物質収納ウエル 52、52・・・を設けた容器 54 を、チップ 14 の直下に位置させて、分離剤溶液をウエル開口 17 から投入して標的物質を当該ウエル 16 内のプローブ担持粒子から分離し、その直下に位置する標的物質収納ウエル 52 へ収容することができる。

#### 【0208】

ウエル底部と上部にフィルターが存在する図 13 (a)、(b)、(c) の場合においても上述した方法に準じた工程にて行なうことができる。例えば図 13 (b) のチップの場合では、図 15 (e-2)、(e-3) に示したように、ノズル 83、84 を介して加減圧空気を出し入れすることにより、上容器 81 内の溶液をウエル 16 内の溶液と一体化させて、上容器 81、下容器 82 に漸次移動させることができる。

#### 【0209】

上記の方法により分離分画された被検体は、次の反応工程の出発物質あるいはアッセイのための精製体として使用することができる。特に質量分析計、ラマン分析計、表面プラズモン分析計、X線分析計、電気化学検出装置、水晶発振子マイクロバランス検出装置などの各検出装置に、分離分画された被検体を投入して、いわゆるラベル剤を必要としない分析方法により、被検体の内容を解析・同定することも可能である。

#### 【0210】

これらの手段により解析するに際して、温度等の反応条件を変えるか、あるいは複数回の経時検出を行うことにより、いわゆるカイネティック (Kinetic) 解析を行うことが可能である。さらに、単に被検体の内容やプローブと反応したリガンドが存在するかどうかを解析するのみならず、ウエル 16 内の各粒子ごとに内容を解析することにより、

被検体に含まれる標的物質の濃度あるいは量を求めることができる。

＜被検体の検出方法＞

本発明の被検体中の標的物質の光学的な検出・同定方法では、前述した被検体中の標的物質とプローブとの反応方法、またはB/F分離方法と同様の工程を行った後、以下の(1)～(3)の工程を行う。

(1) ラベル剤を投入し、プローブと標的物質にラベル剤を結合させ、その後未結合のラベル剤を洗浄除去する。

(2) ウエル内の溶液を底部のフィルターを介してウエル内からウエル外に排出し、ウエル内の粒子をフィルターの細孔に位置させる。

(3) 粒子に担持されたプローブと被検体の標的物質との反応または相互作用を検出する。

【0211】

なお、B/F分離工程は、いわゆるホモジニアス系のアッセイ方法の場合は省略することができる。

【0212】

工程(1)のラベル剤としては、例えばラジオアイソトープ、有機蛍光体、希土類などの錯体系の蛍光体、蛍光蛋白、燐光体、量子効果による発光ナノ粒子、化学発光剤、酵素発光剤、金、銀のナノ粒子等が使用可能である。

【0213】

さらにこれらのラベル剤を結合した二次抗などの二次プローブ、あるいはモレキュラービーコン法のための蛍光分子/消光分子、FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) 法のためのドナー、アクセプター分子なども使用可能である。

【0214】

工程(3)では、粒子ごとに、粒子のプローブ識別情報と、粒子に担持されたプローブと被検体の標的物質との反応または相互作用の情報の双方を検出することができる。また、各ウエルごとの粒子について、粒子に担持されたプローブ識別情報を識別し、次いでプローブと被検体中の標的物質との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の状態情報に基づき、ウエル単位での相互作用情報を算出することができる。

【0215】

以下、本発明の被検体の検出方法の一例について、具体的に説明する。最初に、各ウエルごとに、それぞれ異種のプローブを担持した粒子を収納する。本発明のバイオチップを被検体の検出に用いる場合、各ウエルにおける各プローブごとの粒子数は、好ましくは1～1000個、より好ましくは1～500個、さらに好ましくは1～200個である。

【0216】

次いで、バイオチップ10の容器12内に、被検体を含む溶液を投入して、当該被検体と、各ウエル16内のプローブ担持粒子とを接触させる(図16(a)、(b))。

【0217】

次いで、被検体溶液の界面の高さを、ウエル16のフィルター18の下面以下となるまで低下させて、プローブ担持粒子24に担持したプローブと反応していない被検体を除去する(図17(a))。

【0218】

これらの工程は、前述した被検体の分離分画方法での操作に準じて行われる。なお、未反応の被検体を除去する工程において、図17(b)に示したように洗浄液を導入して粒子の洗浄を行い、必要に応じて洗浄液の導入、攪拌、排出を繰り返して、プローブ担持粒子から未反応の被検体を除去することができる。

【0219】

次いで、図19に示したようにバイオチップ内の溶液を底面フィルターを通して排出し、ウエル16内の粒子を底面フィルター18の孔部分に位置させた後、各ウエル16ごとに、プローブ担持粒子と被検体との反応または相互作用を検出する。

【0220】

従来のように溶液中でプローブ担持粒子と被検体の反応を検出する場合では、反応に寄与した粒子の一部あるいは全部を1つの被検体として検出・同定していたが、このように、溶液の界面の高さをフィルター18の下面未満となるまで低下させ、プローブ付き粒子をフィルター孔上に位置させた状態で検出を行うことにより、反応に寄与した粒子の全てを粒子1個ごとに検出・同定の対象とすることが可能であり、検出感度の向上を図ることができる。図22は、プローブ担持粒子をフィルター孔上に位置させた電子顕微写真である。

#### 【0221】

被検体の検出方法としては、通常行われている各種の方法が適用可能であり、例えば、ラジオアイソトープ検出、蛍光検出、化学発光検出、酵素発光検出、ラマン検出等が挙げられるがこれらに限定されない。

#### 【0222】

上記した検出方法により検出を行うに際して、温度を変えるか、あるいは複数回の経時検出を行うことにより、いわゆるカイネティック (Kinetic) 解析を行うことが可能である。さらに、単に被検体の内容やプローブと反応したリガンドが存在するかどうかを解析するのみならず、ウエル内の各粒子ごとに内容を解析することにより、被検体に含まれるリガンドの濃度あるいは量を求めることができる。

#### 【0223】

また、蛍光発光、化学発光検出、などのいわゆる光学的な検出においては、ウエルからなるチップを収納する容器から、このチップを取り出してチップ単独で励起光の照射、検出光の検出をすることが好ましい。チップを容器から取り出した場合は、励起光はチップ上面、下面のいずれからでも照射可能である。また、検出光もチップ上面、下面のいずれからでも検出可能となる。

#### 【0224】

また、容器からチップを取り出さない場合は、容器を透明とすることで、前記励起光、検出光のいずれもチップの上下から取り出すことが可能となる。

#### 【0225】

容器からチップを取り出すことで容器のゆがみや自家蛍光発光の影響を無くすることが可能であり、また焦点深度が浅くなるために、感度が高いが検出系の焦点深度の浅い共焦点顕微鏡を使用することが可能となる。

#### 【0226】

あるいは、図13(b)または(c)のチップにおいて、反応後検出のために上フィルター付きの上容器81を取り外し、下フィルターに粒子が配列された下フィルター付きの下容器82について、上側開放面から光照射して検出を行うことも可能である。

#### 【0227】

上記の検出工程において、各ウエルごとに、粒子に担持されたプローブと被検体との相互作用に関する状態を計測し、各粒子ごとに得られた相互作用の状態情報に基づきウエル単位での相互作用情報を算出する場合について説明する。まず、各ウエルに収納されているプローブ担持粒子ごとに、プローブと被検体との相互作用に関する情報を計測する。この計測を行う手段としては、上記に記載した各種の方法が使用可能である。例えば、蛍光検出の場合は、同一ウエル内に配列した各粒子に検出のためのUV光あるいは可視光などの励起光を照射して、その結果得られる検出光などの信号をCCDカメラ、蛍光管などで検出する。この方法を粒子ごとに個別に行ない、さらにこの検出操作を他のウエル内の粒子についても同様に逐次行う。次にこれらの得られたデータを各ウエルごとに累積処理して、ウエル内の粒子数Nの各データについて統計的な標準化処理を行なう。また必要に応じてすでに存在する各種のデータベースのデータとの比較参照を行い、当該データの修正処理あるいは判定処理を行うことが可能である。

#### 【0228】

この方法により、例えば従来のバイオチップにおけるウエルあるいはセル単位での光学的な検出方法のように、1つのウエルあるいはセルが発する蛍光強度、蛍光スペクトルを

測定する方法に比して、ウェル内の粒子プローブの個数N個ごとの情報が得られるために情報量が多くなり感度が向上し、あるいはN個の粒子プローブの情報の分布を統計的に処理することにより、定量的な検出・同定が可能となる。

#### 【0229】

また、温度等の反応条件を変化させるか、あるいは複数回の経時検出を行う、いわゆるカイネティック (Kinetic) 解析において、ウェル内粒子ごとに、あるいは粒子の検出パターンを経時的にトレースすることにより、母数Nが多く信頼性の高い解析データを得ることが可能となる。

#### 【0230】

本発明のバイオチップには、そのプローブとして核酸を粒子へ担持したDNAチップの他、抗原および抗体等のタンパクあるいはこれらのタンパクと反応する化学物質を粒子へ担持したプロテインチップ、糖鎖を粒子へ担持した糖鎖チップ、細胞を粒子へ担持した細胞チップ等も含まれる。

#### 【0231】

これらのDNAチップ、プロテインチップ、糖鎖チップおよび細胞チップは、担体上に固定する各種のプローブによって、遺伝子機能解析；遺伝子発現解析；機能プロテオミクスあるいは構造プロテオミクス；機能セローム、構造セローム、疾病解析、各種感染症等の疾病の罹患状況を確認するための臨床検査；遺伝子多型の検出；テーラーメイド医療あるいはケモセラピーと称される患者の遺伝子配列に応じた治療医薬の選定；核酸、タンパク質、細胞、あるいは糖鎖と化学物質の相互作用研究、オーファン受容体リガンド探索；トキシコゲノミクスと称される、医薬品開発のための薬理スクリーニングあるいは化学物質の安全性および毒性のスクリーニング；その他の各種スクリーニング等に応用することができる。また、特定の被検体と特定のプローブの組み合わせにより、免疫アッセイ、タンパク質-DNA、タンパク質-タンパク質等の相互作用アッセイ、蛋白、糖鎖、細胞-リガンドアッセイ、リセプターリガンドアッセイ、キナーゼ等の酵素アッセイなどの各種アッセイ系を組むことができる。

#### 【実施例】

以下、本発明を実施例に基づき説明するが、本発明はこれらの実施例に何ら限定されるものではない。

#### 【実施例1】

#### 【0232】

#### 電鍍によるフィルターとリブの作製

##### 1. フィルターの作製

ステンレス基板 (SUS304、寸法120mm×120mm×厚さ1mm) 上にレジストTHB-110N (商品名: JSR株式会社製) をスピンコーターにて膜厚5μmとなるように塗布し、ホットプレート上にて120℃、5分間プレベークを行った。プレベーク後、マスクアライナーM-3LDF (商品名: ミカサ株式会社製) を用いて400mJ/cm<sup>2</sup>の露光量で電気メッキしない部分を残すように所定のパターンを焼き付けた。現像液にはPD523 (商品名: JSR株式会社製) を用いて現像を行った後、ホットプレート上にて90℃、5分間ポストベークを行った。

#### 【0233】

次いで、pHを4.0から4.5に保ち、浴温度50℃に維持したスルファミン酸ニッケル浴 (浴組成: スルファミン酸ニッケル60%液 700g/l、臭化ニッケル 5g/l、硼酸 35g/l、応力調整剤 1.5g/l、ピット防止剤 2.5ml/l) 中にレジストTHB-110NでパターンニングしたSUS基板を投入し、7Vの電圧で1A/dm<sup>2</sup>の電流密度となるように電圧電流を制御し、30分間直流を印加して厚さ5μm、最小孔径3μm、最小孔間距離7μmのニッケル膜を得た。

#### 【0234】

電気メッキ後、電鍍試料をレジストストリッパーTHB-S1 (商品名: JSR株式会社製) に30分間攪拌浸漬することによって、全てのレジストを剥離してフィルターを得た。

##### 2. リブの作製



電鍍法によって得たニッケルフィルター上に、上記と同じ工程でリブを積み上げることによってリブ付きのフィルターが得られた。装置および電鍍条件は上記のフィルター作製条件とほぼ同じであるが、フィルターの厚さ  $5\mu\text{m}$  に対してリブの厚さは  $50\mu\text{m}$  が得られるように、レジストを THB-220N (商品名: JSR 株式会社製) を用いてスピンコーターで塗布し、 $650\text{mJ}/\text{cm}^2$  の露光量で露光した。また、厚さ  $50\mu\text{m}$  のニッケルメッキ膜を得るためにニッケルメッキを 5 時間行った。

#### 【実施例 2】

##### 【0235】

#### 酸化膜付きシリコンウェハーのエッチングによるフィルターとリブの作製

##### 1. フィルターの作製

レジスト IX1170G (商品名: JSR 株式会社製) を、スピナー (クリーントラック MARK8 (商品名: 東京エレクトロン社製)) を用いて 6 インチ酸化膜付きシリコンウェハー (厚さ  $2\mu\text{m}$ ) 上に  $3300\text{rpm}$  で 30 秒間スピンコートし、ホットプレート (クリーントラック MARK8 (商品名: 東京エレクトロン社製)) で  $90^\circ\text{C}$ 、60 秒間乾燥して膜厚  $0.86\mu\text{m}$  のレジスト膜を得た。このレジスト膜に縮小投影露光装置 NSR-2205i12D (商品名: ニコン社製、 $\text{NA}=0.57$ 、 $\text{シグマ}=0.60$ ) を用いて  $0.4\mu\text{mC}/\text{H}$   $1000\text{ms}$  ec、 $0.8\mu\text{mC}/\text{H}$   $580\text{msec}$  の露光量で露光した後、現像液 PD523AD (商品名: JSR 株式会社製) を用い、 $23^\circ\text{C}$  で 1 分間パドル現像した。次いで 20 秒間水洗し、乾燥してレジストパターンを得た。

##### 【0236】

レジストパターンを施した酸化膜付きシリコンウェハーに、プラズマエッチング装置を用いて  $\text{CF}_4$  プラズマを RIE モードで照射した後、 $\text{O}_2$  プラズマでレジストを除去して酸化膜に直径  $0.4\mu\text{m}$  および直径  $0.8\mu\text{m}$  の孔が形成されたフィルターを得た。

##### 2. リブの作製

フィルター加工を施した面とは逆側の面に、レジスト (THB-151N) をスピナー (スピンコーター 1H-DX2 (商品名: ミカサ株式会社製)) を用いて、 $1700\text{rpm}$  で 20 秒間スピンコートし、ホットプレートで  $120^\circ\text{C}$ 、5 分間乾燥して膜厚  $40\mu\text{m}$  のレジスト膜を得た。このレジスト膜に等倍投影露光装置 MA-150CC (商品名: ズースマイクロテック社製) を用いて露光した後、現像液 PD523AD (商品名: JSR 株式会社製) を用い、 $23^\circ\text{C}$  で 90 秒間パドル現像した。ついで 30 秒間水洗し、乾燥してレジストパターンを得た。

##### 【0237】

レジストパターンを施した酸化膜付きシリコンウェハーに、プラズマエッチング装置を用いて  $\text{SF}_6$  プラズマを RIE モードで照射した後、 $\text{O}_2$  プラズマでレジストを除去してシリコンに直径  $500\mu\text{m}$  の孔が形成されたリブを得た。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0238】

【図 1】図 1 は、本発明の一実施形態によるバイオチップが備えるウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

【図 2】図 2 (a)、(b)、(c) は、フィルターの細孔の一例を模式的に示した断面図である。

【図 3】図 3 (a)、(b) は、補強用リブ部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

【図 4】図 4 は、フィルター面上に補強用リブ部を設けた様子を模式的に示した上面図である。

【図 5】図 5 は、フィルター面上に補強用リブ部を設けたウエル底部の電子顕微写真である。

【図 6】図 6 (a)、(b)、(c) は、補強用リブ部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

【図 7】図 7 は、補強用リブ部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

【図 8】図 8 は、補強用リブ部に位置合わせ用凹部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

【図 9】図 9 は、ウエルの底部上面に、その周縁から所定の幅で無孔部を設けたウエルの底部側を模式的に示した断面図である。

【図 10】図 10 (a)、(b) は、リブあるいはウエルを光造型で作製する方法を説明する図である。

【図 11】図 11 は、本発明の一実施形態によるバイオチップの上面図および A-A' 断面図である。

【図 12】図 12 は、本発明の一実施形態によるバイオチップの上面図および A-A' 断面図である。

【図 13】図 13 は、第一のフィルターとともに第二のフィルターを備えるバイオチップの断面図である。

【図 14】図 14 は、複数のウエルからなるチップを作製する方法を説明する図である。

【図 15】図 15 は、本発明に係るバイオチップの操作方法を説明する図である。

【図 16】図 16 は、本発明に係る被検体中の標的物質の分離分画方法および検出方法の一工程を説明するチップ断面図である。

【図 17】図 17 は、本発明に係る被検体中の標的物質の分離分画方法および検出方法の一工程を説明するチップ断面図である。

【図 18】図 18 は、本発明に係る被検体中の標的物質の分離分画方法の一工程を説明するチップ断面図である。

【図 19】図 19 は、本発明に係る被検体中の標的物質の検出方法の一工程を説明するチップ断面図である。

【図 20】図 20 は、ウエルにプローブ担持粒子を収納した本発明のバイオチップの一例を説明する図である。

【図 21】図 21 は、本発明のバイオチップのウエルに被検体を投入する方法を説明する図である。

【図 22】図 22 は、プローブ担持粒子をフィルター孔上に位置させた電子顕微写真である。

【符号の説明】

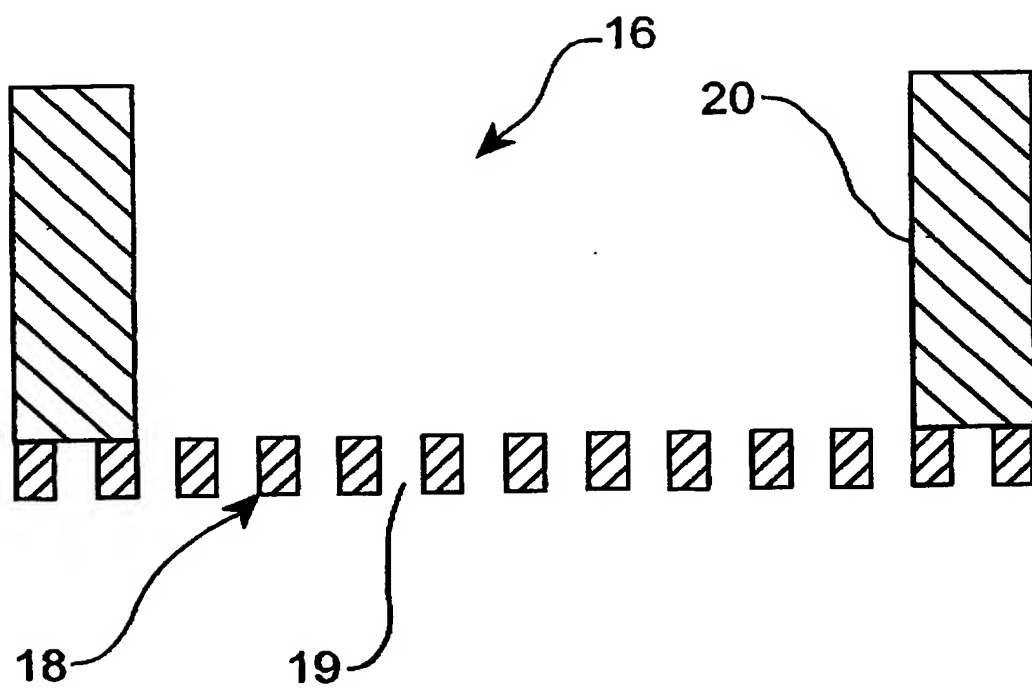
【0239】

- 10 バイオチップ
- 12 容器
- 14 チップ
- 16 ウエル
- 17 ウエル開口
- 18 フィルター
- 19 細孔
- 20 ウエル側壁 (側部)
- 22 底壁
- 23 補強用リブ部
- 24 プローブ担持粒子
- 25 被検体
- 26 溶液収納室
- 27 凹部
- 27' 凸部
- 28 無孔部
- 29 貫通孔
- 32 凸頂部
- 34 凹頂部



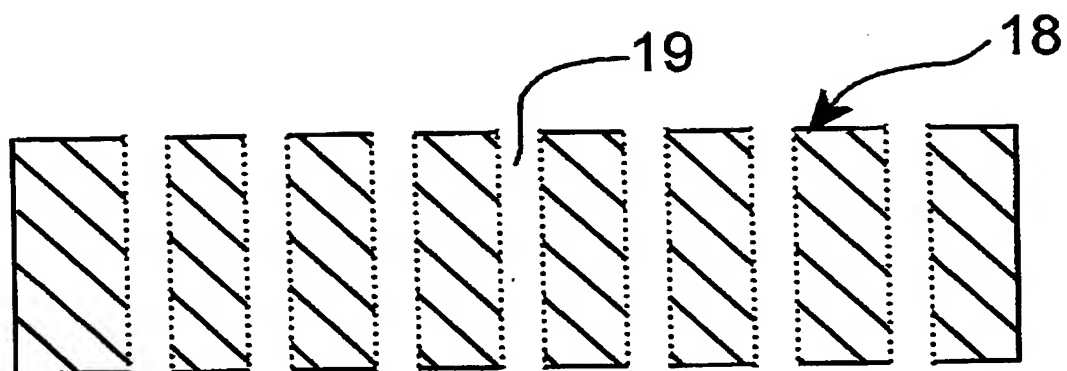
- 4 2 導入口
- 4 4 排出口
- 5 2 標的物質収納ウエル
- 5 4 容器
- 6 2 検出光
- 6 4 検出光
- 7 1 ベース板
- 7 2 光造形機バス
- 7 3 エレベータ
- 8 1 上容器
- 8 2 下容器
- 8 3 ノズル
- 8 4 ノズル
- 8 5 溶液
- 8 6 ノズル

【書類名】 図面  
【図 1】

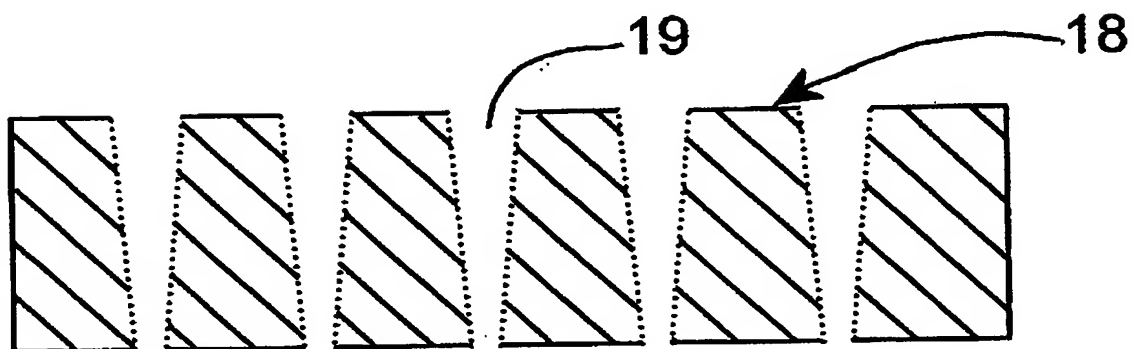


【図 2】

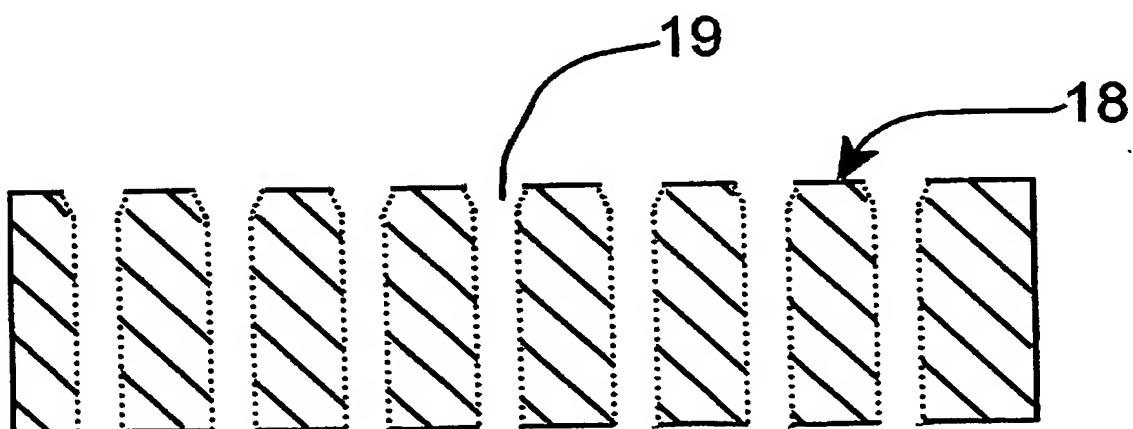
(a)



(b)

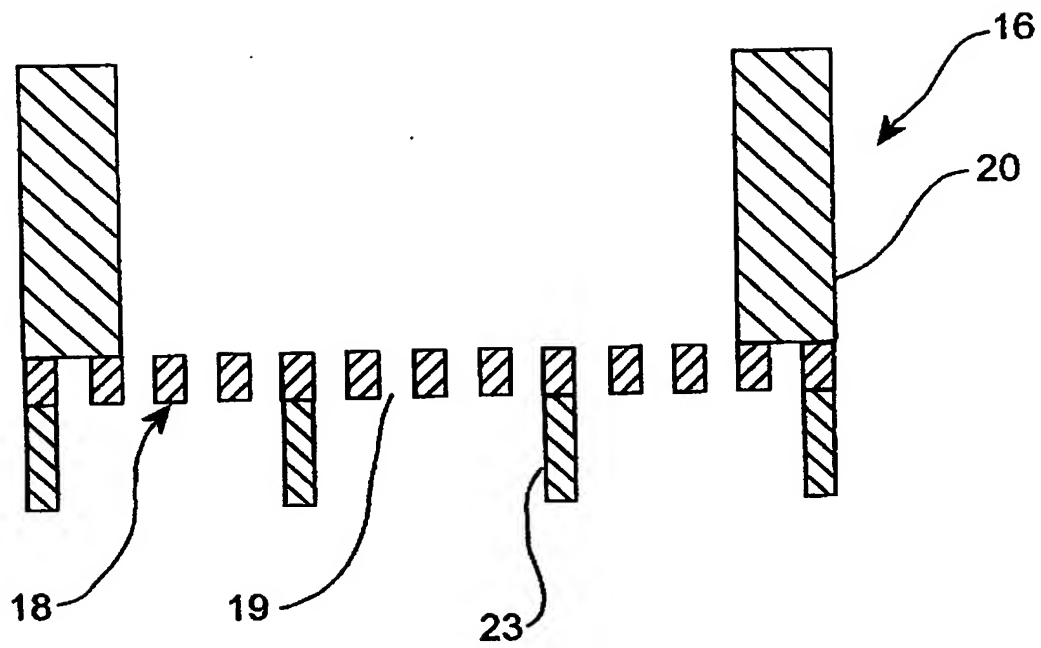


(c)

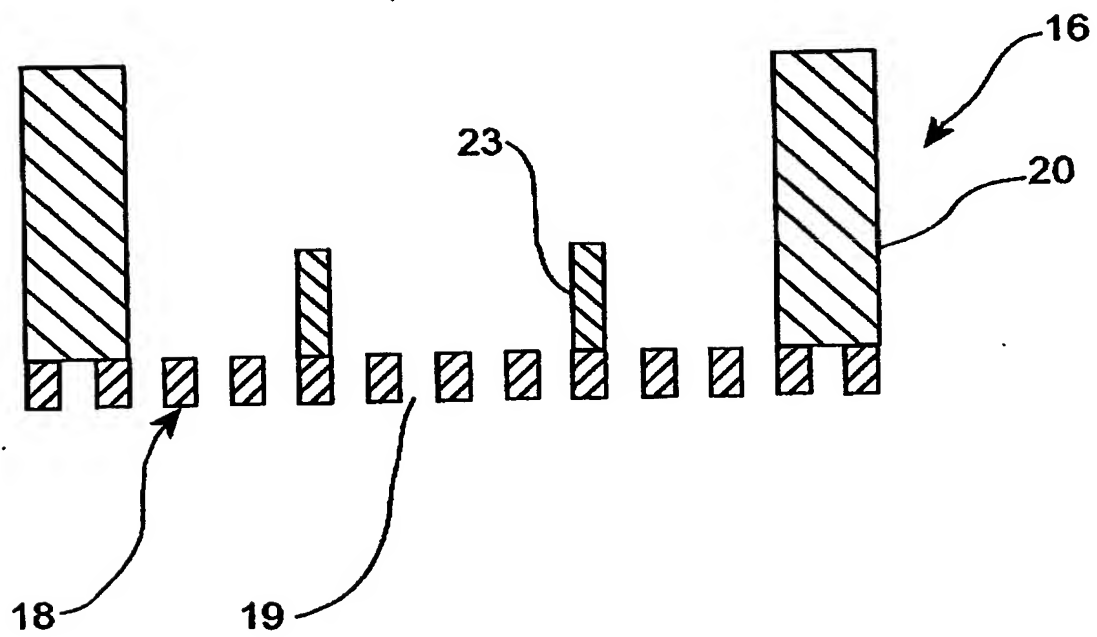


【図 3】

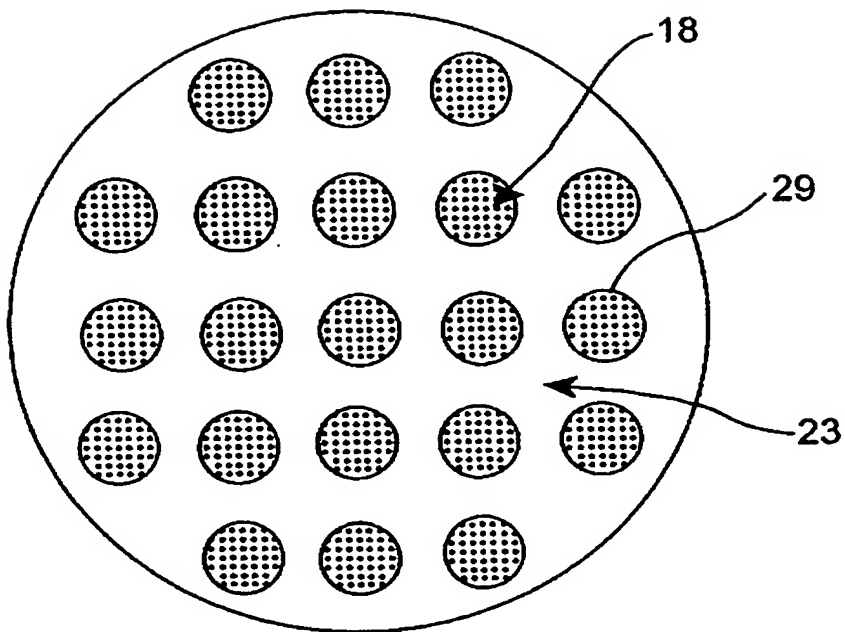
(a)



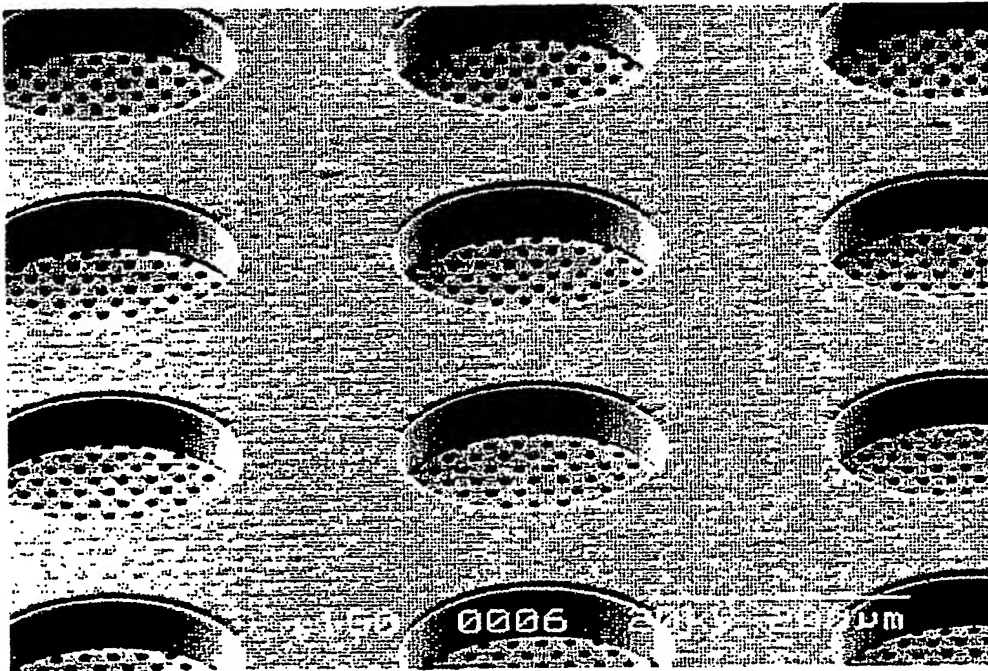
(b)



【図 4】

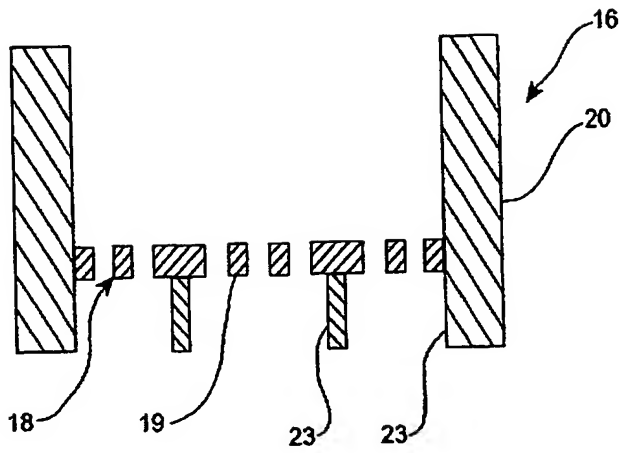


【図 5】

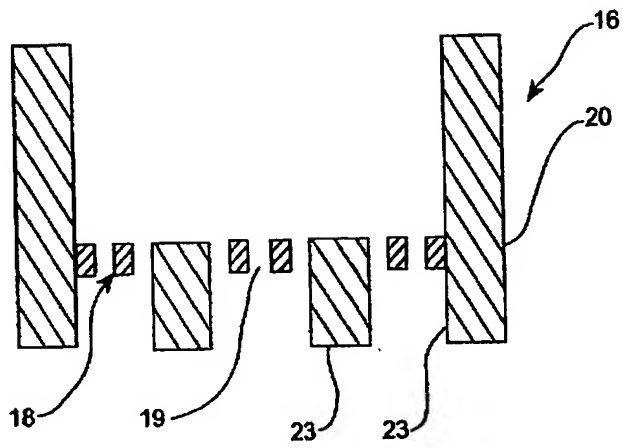


【図 6】

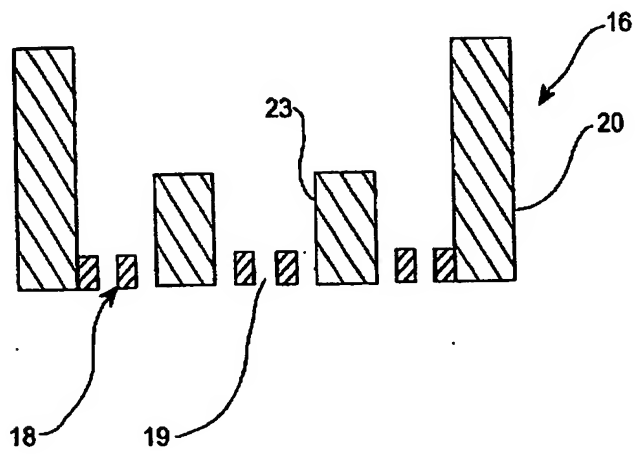
(a)



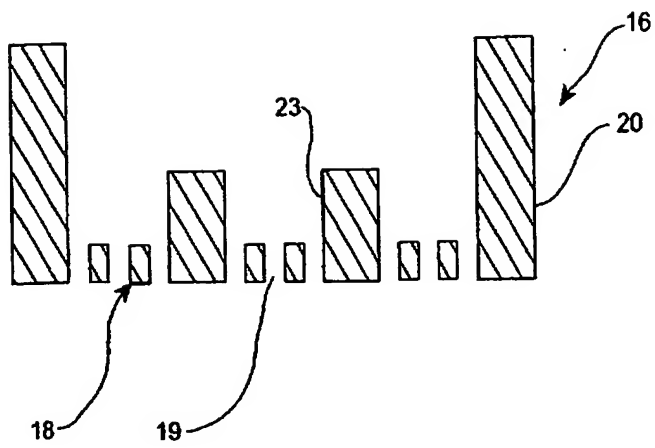
(b)



(c)

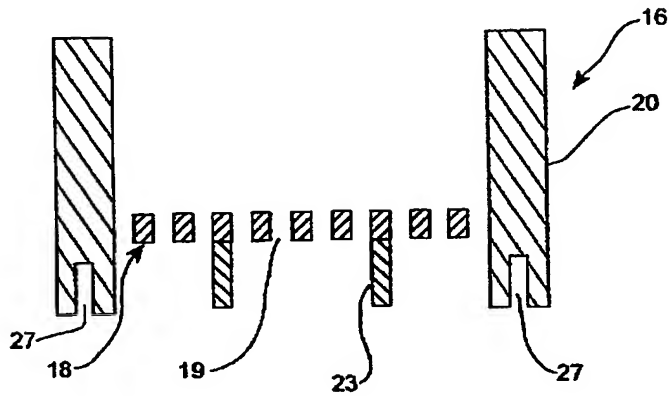


【図 7】

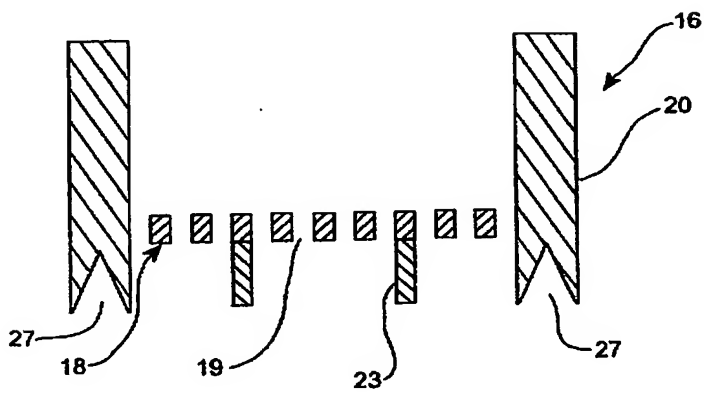


【図 8】

(a)



(b)

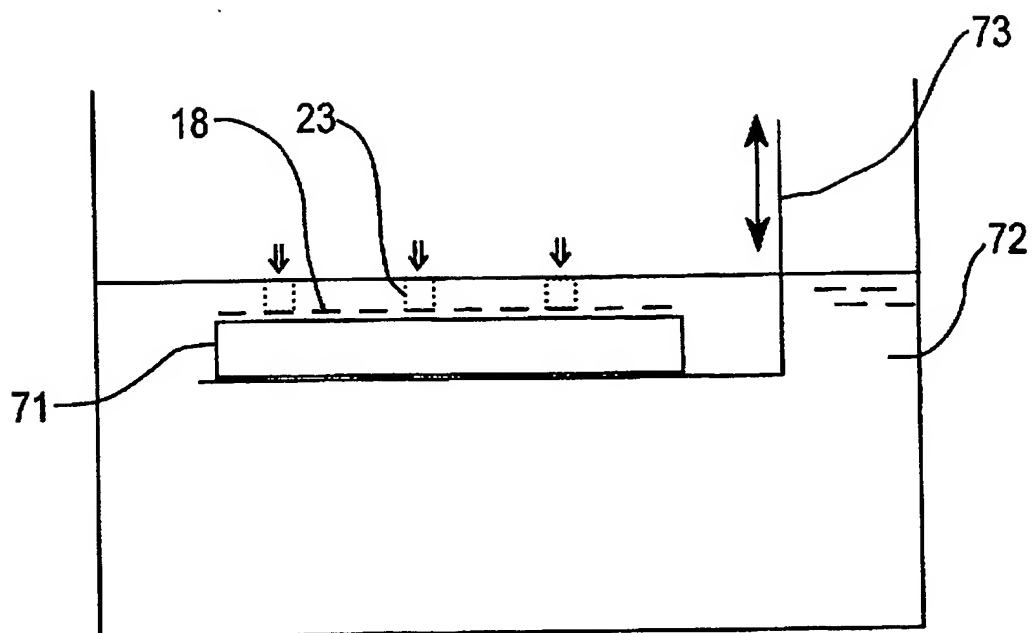




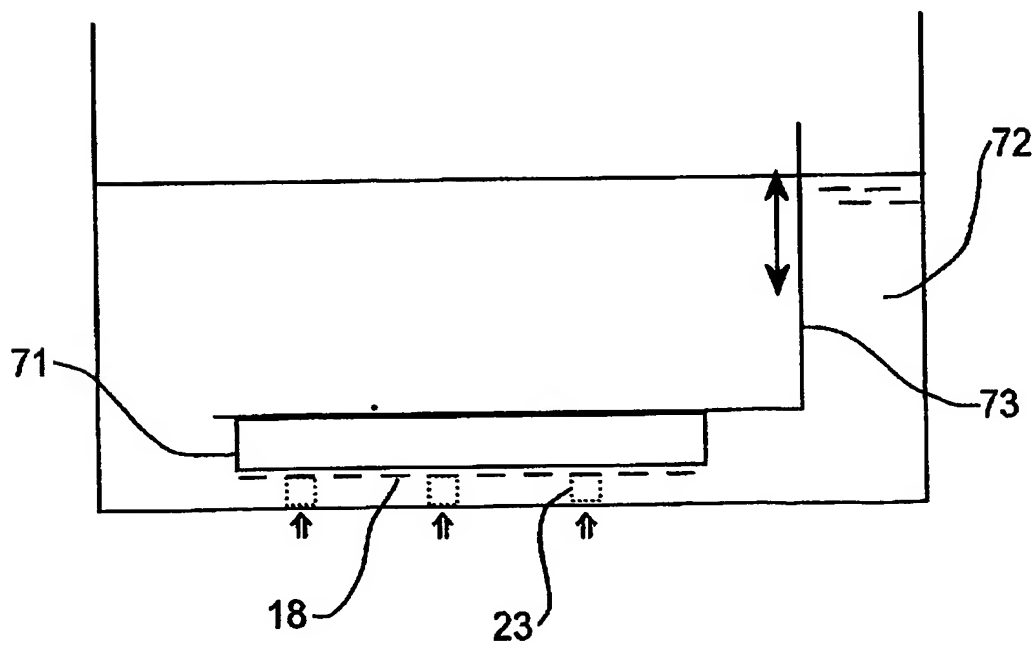


【図 10】

(a)

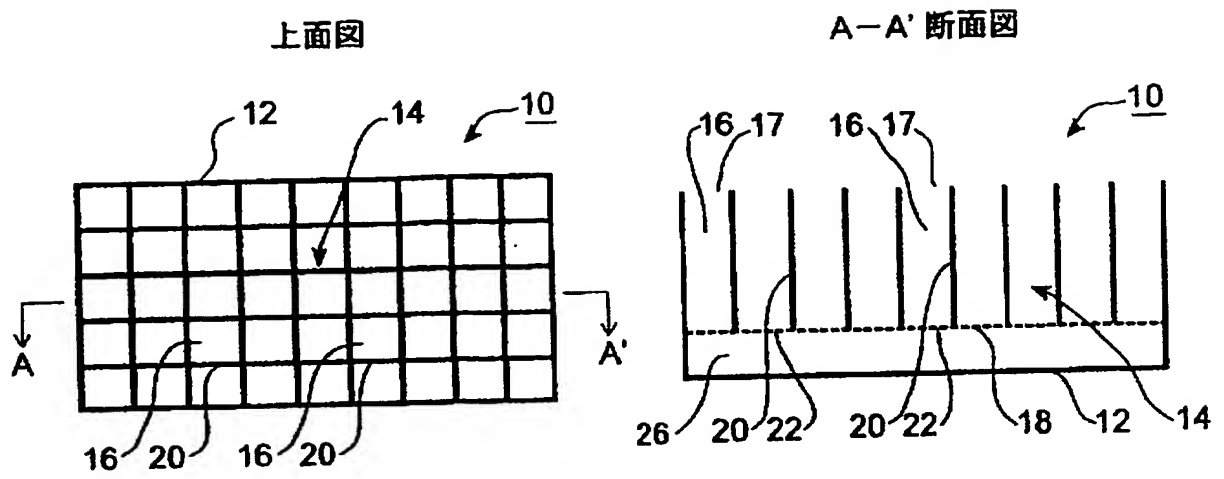


(b)

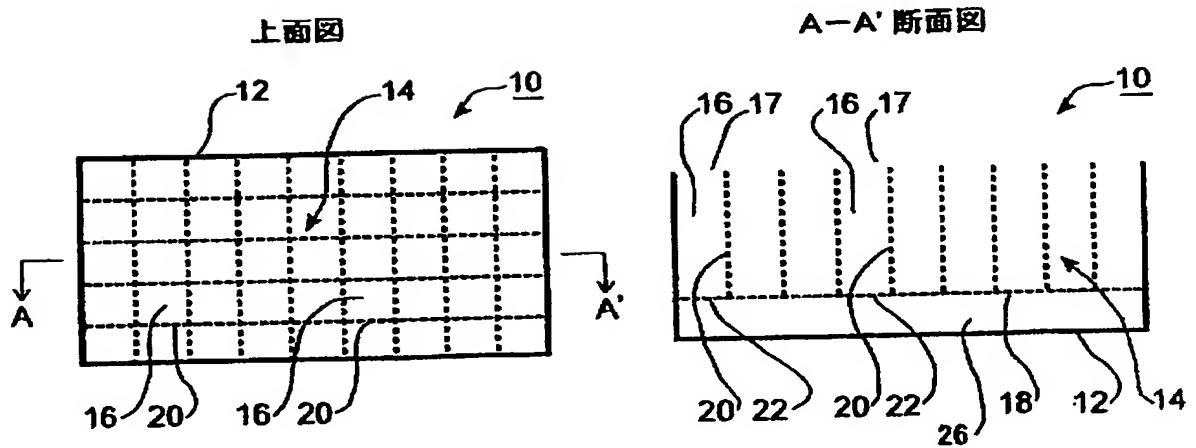


【図 11】

(a)

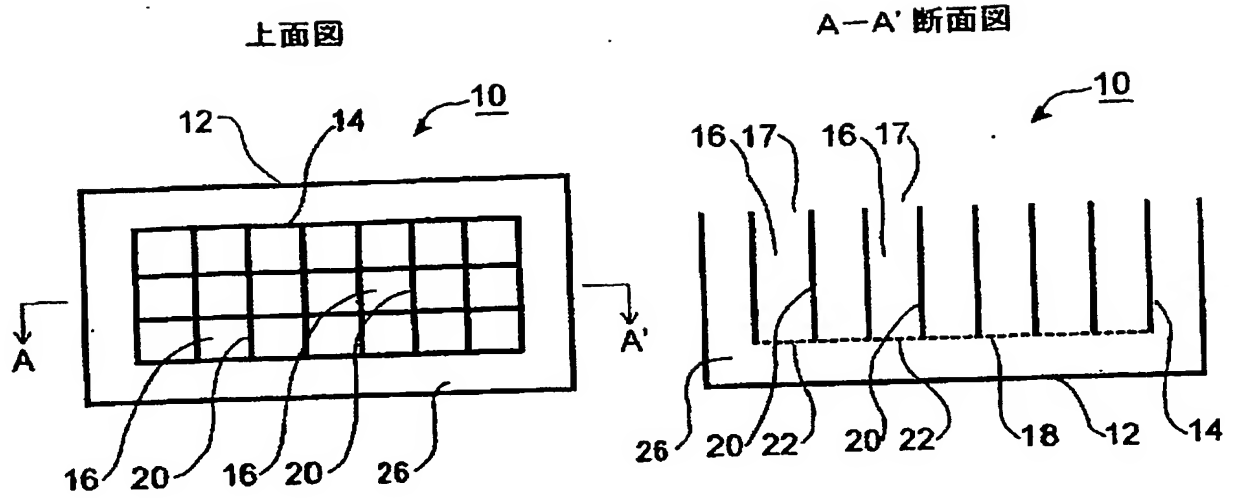


(b)

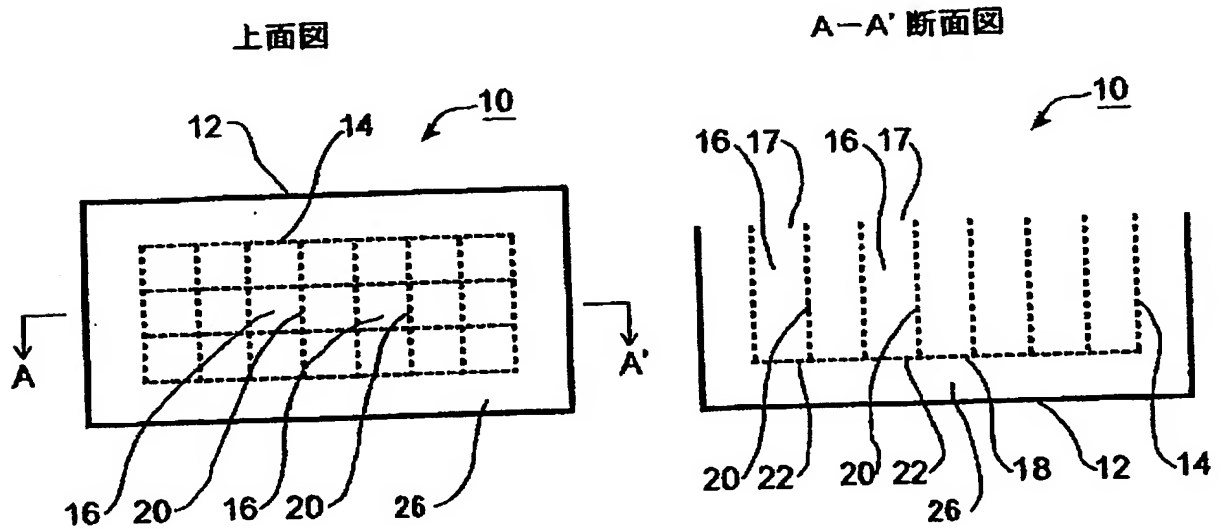


【図 12】

(a)

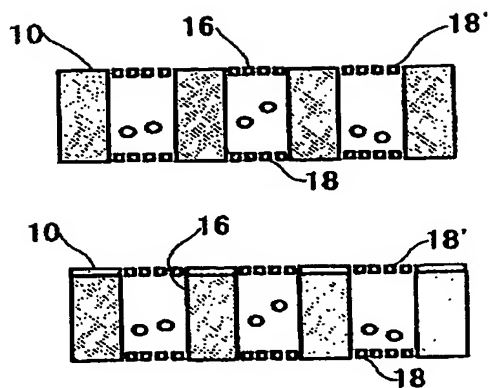


(b)

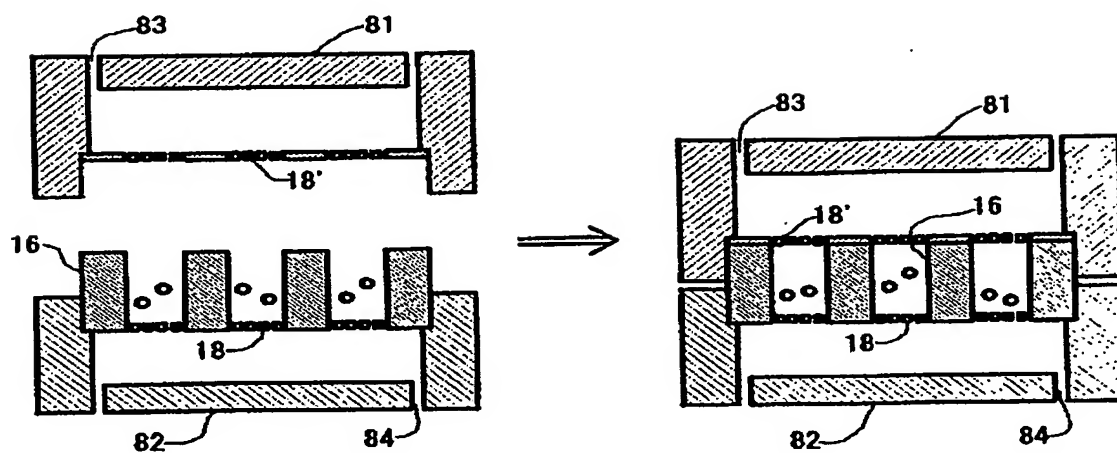


【図 13】

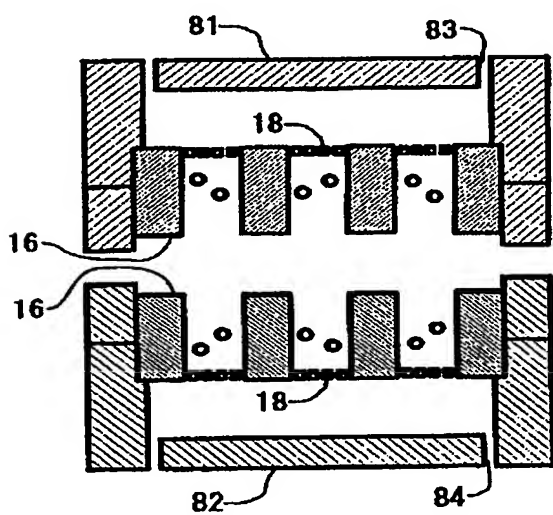
(a)



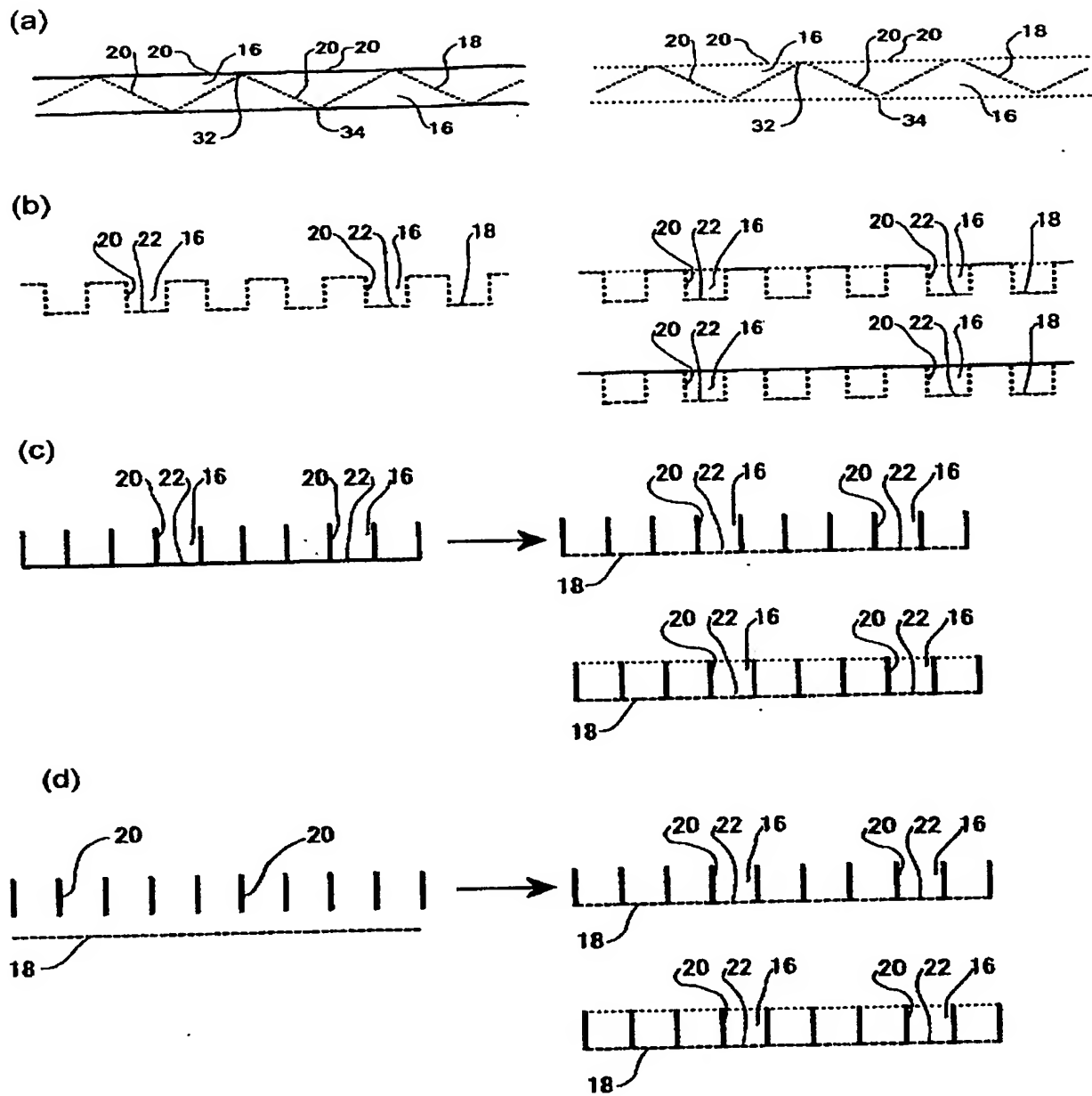
(b)



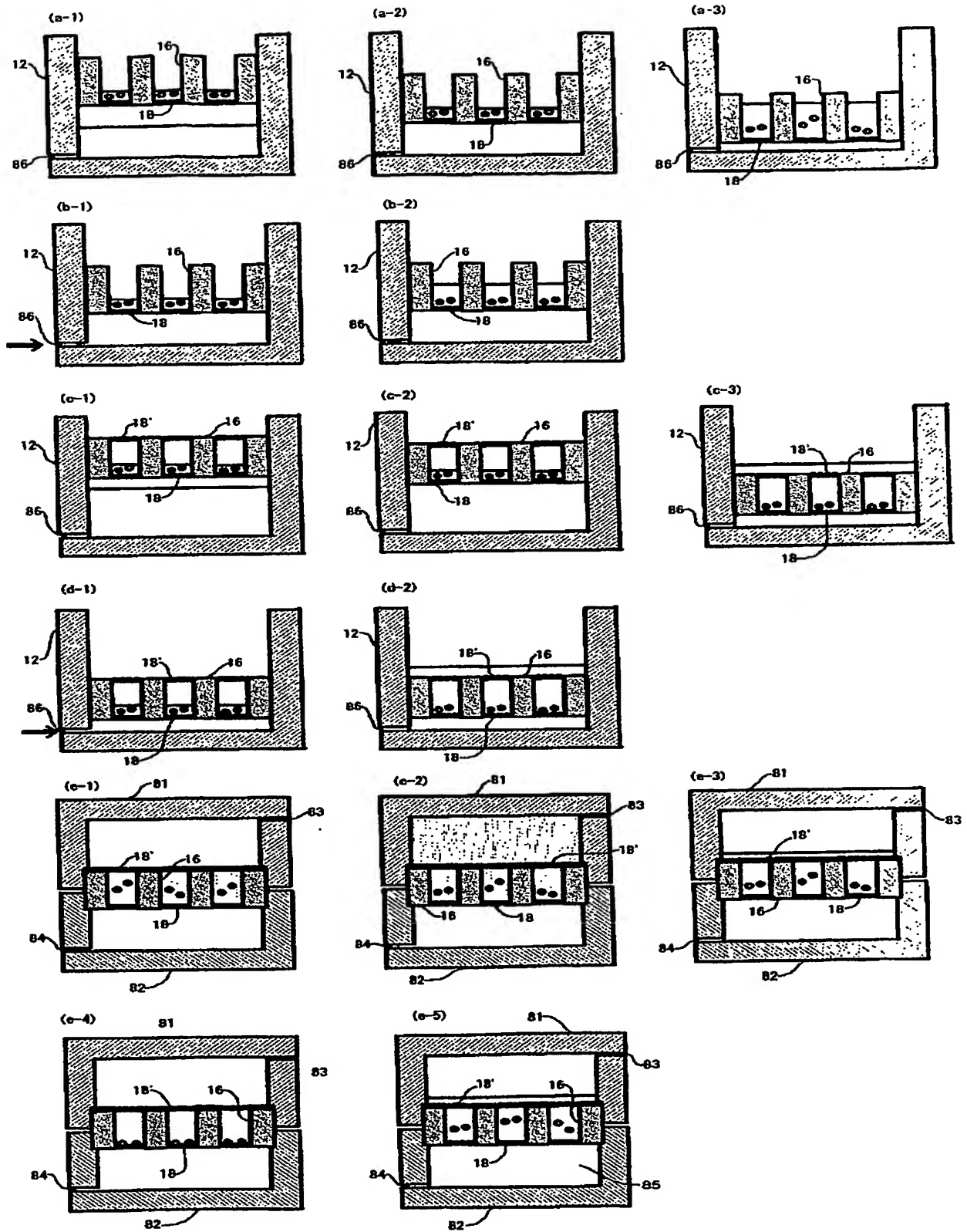
(c)



【図 14】



【図 15】

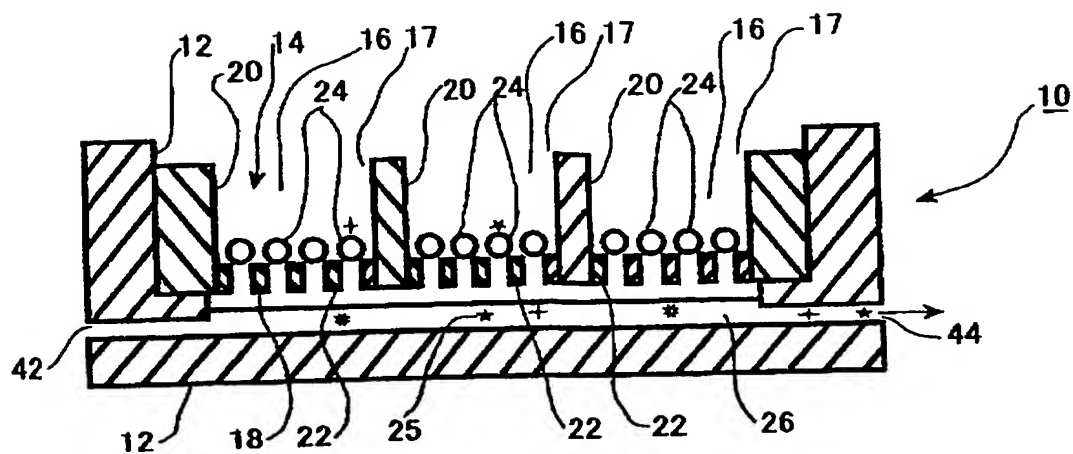




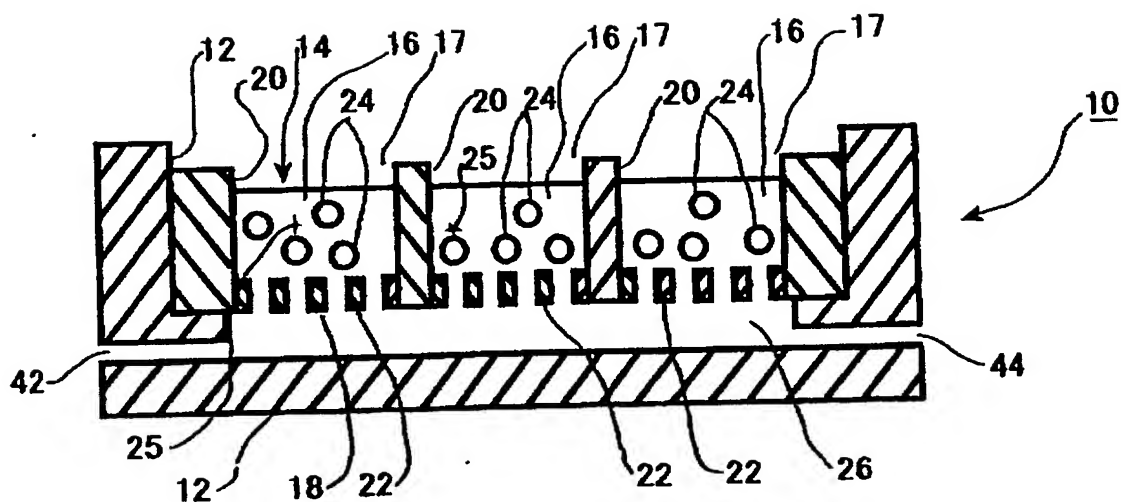


【図 17】

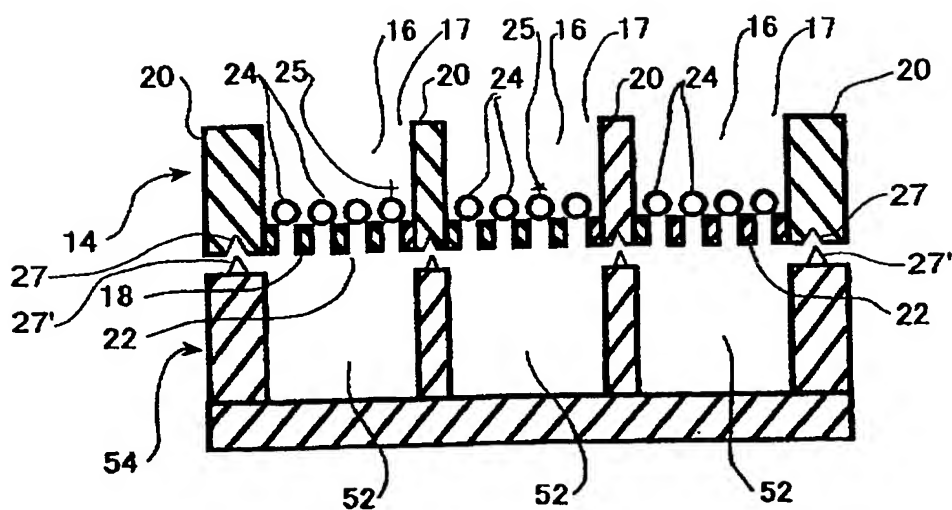
(a)



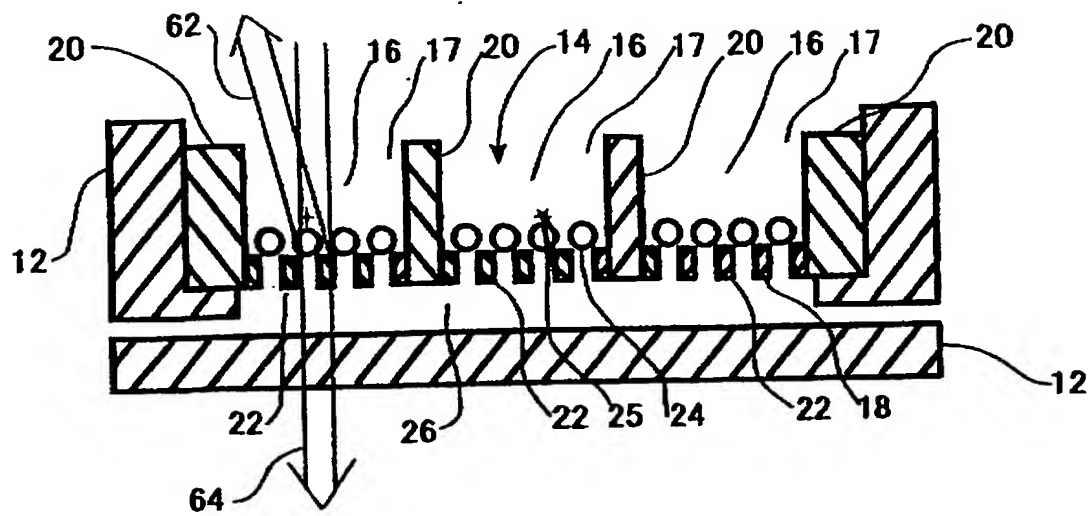
(b)



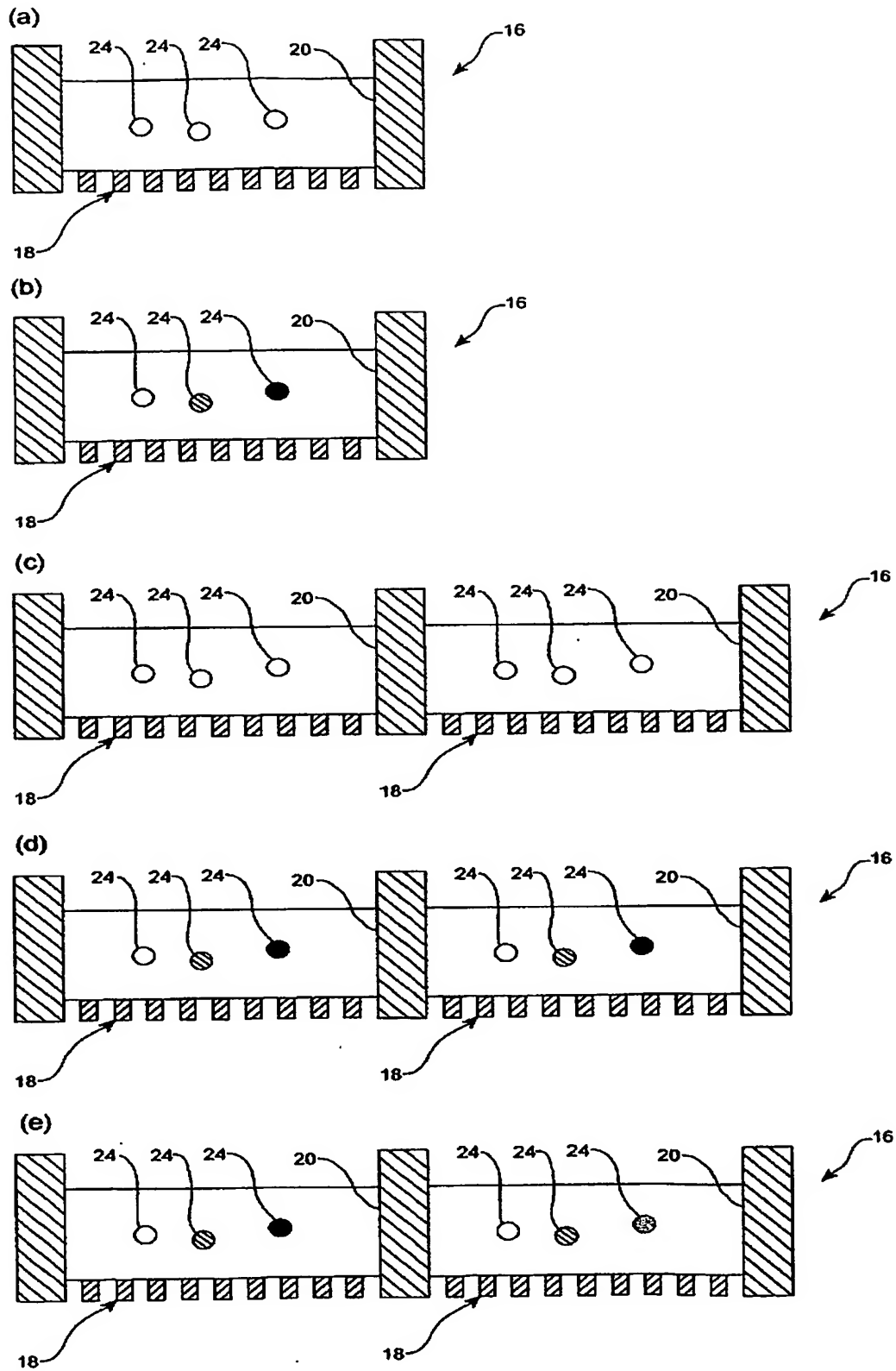
【図 18】



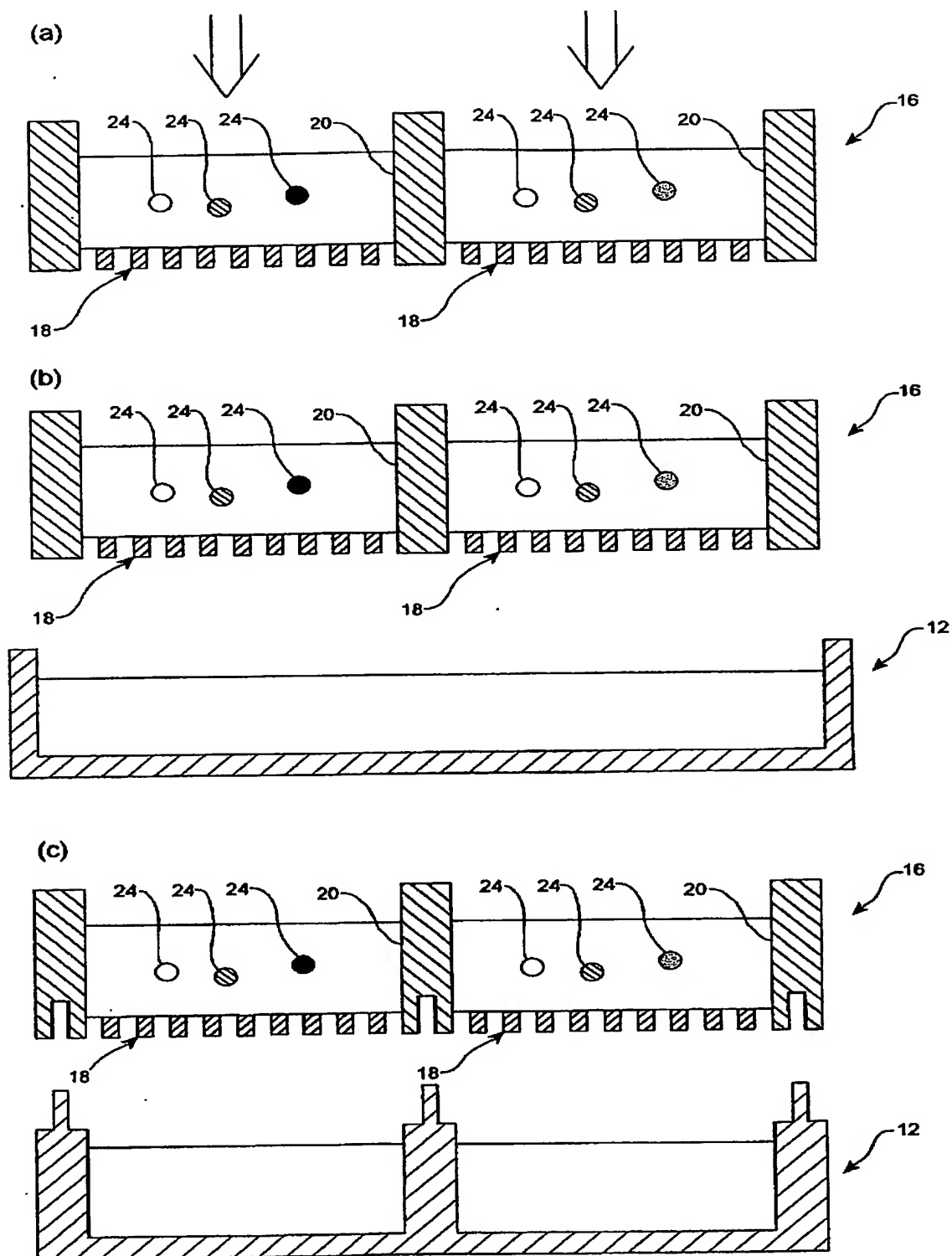
【図19】



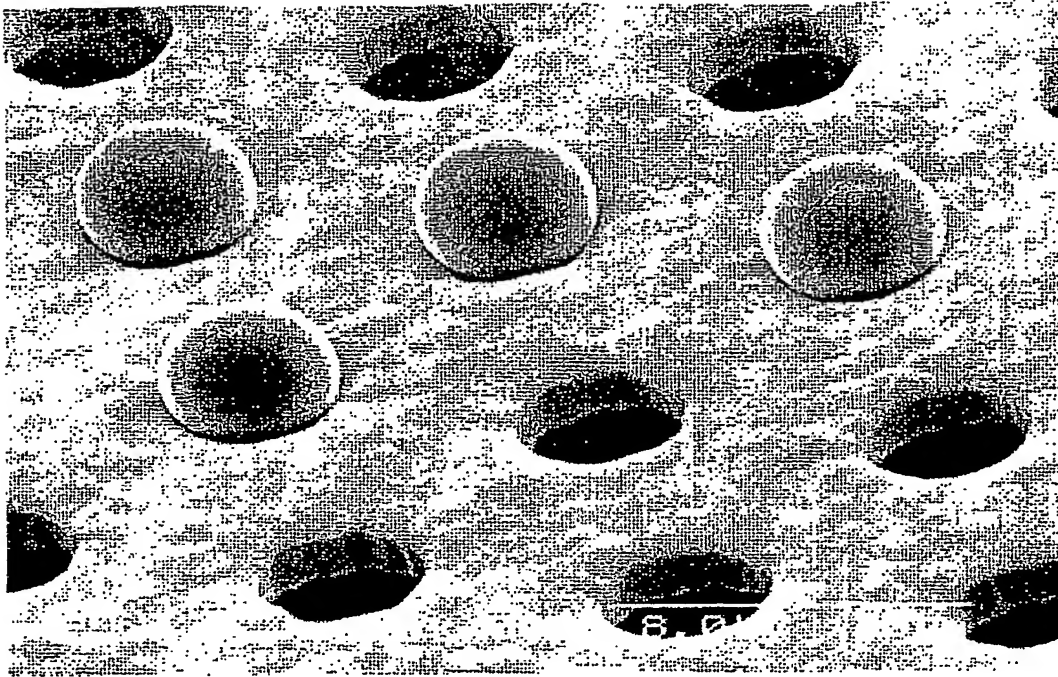
【図 20】



【図 21】



【図 22】



**【書類名】 要約書****【要約】**

**【課題】** 高効率に短時間で被検体中の標的物質とプローブが反応し、B/F分離効率が高く、高感度での定量検出が可能であるバイオチップおよび、当該バイオチップを用いた、被検体中の標的物質とプローブとの反応方法、被検体中の標的物質の分離分画方法および検出・同定方法等を提供する。

**【解決手段】** 均一な孔径を有するストレートな細孔19が均一な孔間隔で形成されたフィルター18が底部もしくは上部に設けられた単数もしくは複数のウエル16を備え、このウエル16に、プローブ担持粒子が分散された分散液が収容され、ウエル16へ被検体を投入してプローブ担持粒子と反応させる。被検体溶液などの溶液は、フィルター18を通してウエル16へ導入、あるいはウエル16から排出させることができる。

**【選択図】** 図1



## 認定・付加情報

|         |                   |
|---------|-------------------|
| 特許出願の番号 | 特願 2003-363623    |
| 受付番号    | 50301760796       |
| 書類名     | 特許願               |
| 担当官     | 金井 邦仁 3072        |
| 作成日     | 平成 15 年 10 月 30 日 |

## &lt; 認定情報・付加情報 &gt;

## 【特許出願人】

|          |                      |
|----------|----------------------|
| 【識別番号】   | 000004178            |
| 【住所又は居所】 | 東京都中央区築地五丁目 6 番 10 号 |
| 【氏名又は名称】 | J S R 株式会社           |

## 【特許出願人】

|          |                    |
|----------|--------------------|
| 【識別番号】   | 502128800          |
| 【住所又は居所】 | 東京都新宿区若葉一丁目 22 番 1 |
| 【氏名又は名称】 | 株式会社オクテック          |

## 【代理人】 申請人

|          |  |
|----------|--|
| 【識別番号】   | 100081994  |
| 【住所又は居所】 | 東京都品川区西五反田七丁目 13 番 6 号 五反田<br>山崎ビル 6 階 鈴木国際特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 鈴木 俊一郎   |

## 【選任した代理人】

|          |  |
|----------|--|
| 【識別番号】   | 100103218  |
| 【住所又は居所】 | 東京都品川区西五反田 7 丁目 13 番 6 号 五反田<br>山崎ビル 6 階 鈴木国際特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 牧村 浩次  |

## 【選任した代理人】

|          |  |
|----------|--|
| 【識別番号】   | 100107043  |
| 【住所又は居所】 | 東京都品川区西五反田七丁目 13 番 6 号 五反田<br>山崎ビル 6 階 鈴木国際特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 高畑 ちより   |

## 【選任した代理人】

|          |  |
|----------|--|
| 【識別番号】   | 100110917  |
| 【住所又は居所】 | 東京都品川区西五反田 7 丁目 13 番 6 号 五反田<br>山崎ビル 6 階 鈴木国際特許事務所 |
| 【氏名又は名称】 | 鈴木 亨   |

特願 2003-363623

出願人履歴情報

識別番号 [000004178]

1. 変更年月日 2003年 9月 1日

[変更理由] 名称変更

住 所 東京都中央区築地五丁目6番10号

氏 名 J S R 株式会社

特願 2003-363623

出願人履歴情報

識別番号

[502128800]

1. 変更年月日

2002年 5月 8日

[変更理由]

名称変更

住 所

東京都新宿区若葉一丁目22番1

氏 名

株式会社オクテック